

Laura Zillmer

Validação e desenvolvimento do método de imunonefelometria em papel filtro para o diagnóstico da deficiência de alfa-1 antitripsina em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica no Brasil

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO

2013

Laura Zillmer

Validação e desenvolvimento do método de imunonefelometria em papel filtro para o diagnóstico da deficiência de alfa-1 antitripsina em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica no Brasil

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa de Pós-graduação em
Medicina Translacional

Coordenadora: Prof. Dra. Dulce Elena Casarini

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Jardim

Co-orientador: Prof. Dr. Oliver A. Nascimento

SÃO PAULO

2013

Zillmer, Laura

Validação e desenvolvimento do método de imunonefelometria em papel filtro para o diagnóstico da deficiência de alfa-1 antitripsina no Brasil / Laura Zillmer.- São Paulo, 2013.

XVI;82

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Jardim

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional.

Validation of a immune nephelometric method on filter paper for the diagnosis of alpha 1 antitrypsin in Brazil

1. Deficiência de Alfa-1 Antitripsina 2. Papel filtro 3. Imunonefelometria
4. Testes diagnósticos

Laura Zillmer

**Validação e desenvolvimento do método de imunonefelometria
em papel filtro para o diagnóstico da deficiência de alfa-1
antitripsina no Brasil**

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Jardim

BANCA EXAMINADORA

Membros Titulares:

Prof. Dr. Leandro Genehr Fritscher

Profa. Dra. Maria da Penha Uchoa Sales

Profa. Dra. Jaqueline Sonoe Ota Arakaki

Suplente:

Dra. Andréa Kelly da Silveira Carvalho

Dedico esta dissertação à memória dos meus queridos avós Beatriz e Ney Zillmer, aqueles que com esforço e dedicação me possibilitaram a base de tudo;

Aos meus amados pais, meu verdadeiro porto seguro, que nunca mediram esforços para ver meus olhos brilhando e que sempre me ensinaram a lutar e a persistir, mesmo diante de adversidades;

Ao meu irmão, meu melhor amigo, você sempre foi e sempre será meu maior ídolo;

Aos meus avós Cecília e Amaro, pelo carinho, amor e apoio incondicional;

Ao meu amado marido, agradeço por todo amor, companheirismo, compreensão e, acima de tudo, pelo grande amor dedicado. Em todos os momentos em que as dificuldades pareciam ser grandes demais, ele esteve ali para me acolher, incentivar e encorajar. Sem a sua tranquilidade, segurança e amor este percurso certamente seria mais penoso.

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e pela família maravilhosa que me reservou;

Agradeço ao meu orientador Dr. José Roberto Jardim, que me inspirou desde o início da minha trajetória acadêmica e me ofereceu brilhantemente pilares para o desenvolvimento deste sonho;

Ao meu coorientador Oliver Nascimento, pela atenção e a ajuda que foram fundamentais no desenvolvimento desta pesquisa;

Ao meu companheiro de vida e de pesquisa Rodrigo Russo, que esteve ao meu lado em todos os momentos deste trabalho, que nos trouxe muito mais que nossas teses, nos uniu e fortaleceu para a vida;

Aos colegas e amigos Ivan e Bia, pela amizade e ajuda na coleta de dados;

Aos meus amigos da reabilitação pulmonar, pelos bons momentos compartilhados, incentivo e apoio;

À minha querida amiga Nívia por me ajudar desde o início;

À Siemens por nos ajudar a desenvolver este trabalho; e especialmente, à Técnica da Siemens – Cláudia, que nos auxiliou com as dosagens da AAT;

À AFIP – Associação Fundo de Incentivo a Pesquisa –, pelo acolhimento e cordialidade que permitiram a realização deste trabalho;

Ao colega Gildo, pela ajuda com o manuseio das amostras e dosagem da AAT;

À equipe do Hospital Universitário Vall d' Hebron (Barcelona, Espanha), principalmente a Marc Mirtavittles e Francisco Rodríguez pelas orientações para o desenvolvimento da técnica e por estarem sempre dispostos a ajudar;

Ao colega Altay, pelo auxílio com o desenvolvimento da estatística deste trabalho;

Aos pacientes que participaram desta dissertação e pela aprendizagem proporcionada;

À Comissão de Pós-Graduação, pela serenidade e apoio em transmitir ensinamentos essenciais durante este período;

À ABRADAT - Associação Brasileira de Deficiência de Alfa-1 Antitripsina –, pelo apoio financeiro que possibilitaram o desenvolvimento da técnica em papel filtro no Brasil, especialmente ao presidente da associação Arnaldo Rey;

À CAPES - Coordenadoria de Amparo a Pesquisa e Ensino Superior –, pelo auxílio financeiro com bolsa de Pós-Graduação;

À FAPESP – Fundação de apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo –, pelo apoio financeiro fundamental para a elaboração desta pesquisa;

***“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez”
(George Bernard Shaw)***

Introdução: A deficiência de alfa-1 antitripsina é uma desordem genética que resulta no aparecimento precoce de enfisema pulmonar e doença hepática. A Organização Mundial de Saúde e *American Thoracic Society /European Respiratory Society* preconizam que os pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica realizem o rastreamento para deficiência de alfa-1 antitripsina. No entanto, existe a necessidade de exames mais acessíveis para possibilitar a realização dessa orientação em países com extensa dimensão territorial, como o Brasil. A técnica em papel filtro é um procedimento simples, que tem sido amplamente utilizado para o rastreamento genético e diagnóstico de diversas doenças.

Objetivo: Validação do método de dosagem de alfa-1 antitripsina por imunonefelometria em amostras de papel filtro em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica no Brasil.

Métodos: Foi analisada a dosagem da alfa-1 antitripsina plasmática e em papel filtro de 192 pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. Para a análise o papel filtro (WhatmanTM, GE, 903, lot W101, USA) foi picotado em discos com diâmetro de 6 mm e, posteriormente, diluídos em 200 µL de soro fisiológico permanecendo a 4°C durante 12 horas. Tanto as amostras de papel filtro quanto de plasma foram analisadas no equipamento da Siemens BNII pelo método de imunonefelometria.

Resultados: O coeficiente de correlação entre a concentração de alfa-1 antitripsina sérica e no papel filtro foi de $r = 0,45$. Através da técnica de reamostragem “bootstrap” foi determinado um ponto de corte de 2,02 mg/dL, com um intervalo de confiança de 1,45 – 2,64 mg/dL (97%), para o papel filtro. Com o ponto de corte de 2,02 no papel filtro foi observado sensibilidade de 100%, especificidade de 95,7% e valor preditivo positivo de 27,2% e negativo de 100%.

Conclusão: O método em papel filtro se mostrou uma ferramenta confiável para o rastreamento de pacientes com deficiência de alfa-1 antitripsina. Entretanto, recomenda-se que os indivíduos que apresentarem valores da alfa-1 antitripsina no papel filtro abaixo do valor máximo do intervalo de confiança (2,64 mg/dL) sejam investigados por meio de testes mais específicos, garantindo maior confiabilidade ao método.

Introduction: The deficiency of alpha-1 antitrypsin is a genetic disorder that results in early onset of emphysema and liver disease. The World Health Organization and American Thoracic Society /European Respiratory Society recommend that patients with chronic obstructive lung disease perform screening for alpha-1 antitrypsin deficiency. However, we see the need for testing more accessible, thus enabling the realization of this approach in countries with extensive territorial dimension, such as Brazil. A technical with dried blood spots is a simple method that has been widely used for genetic screening and diagnosis of various diseases.

Objective: to determine the accuracy of the dried blood spots for quantifying alpha-1 antitrypsin concentrations by immunonephelometry in patients with chronic obstructive lung disease in Brazil.

Method: Serum and dried blood spots samples were tested for alpha-1 antitrypsin in 192 patients with chronic obstructive lung disease. To prepare the dried blood spots perforated discs with a diameter of 6 mm were obtained from the paper filter (WhatmanTM, GE, 903, lot W101, USA) and then eluted with 200 µmL phosphate-buffered saline (pH 7.4) overnight at 4°C. Serum and dried blood spots samples were determined using a rate immune nephelometric method (Siemens, BNII).

Results: The correlation coefficient between the concentration of alpha-1 antitrypsin in serum and dried blood spots was $r = 0.45$. By resampling technique "bootstrap" determined a cutoff value of 2.02 mg / dl with a confidence interval 1.45 to 2.64 mg / dL (97%) to the filter paper. With a cutoff of 2.02 observed in dried blood spots sensitivity 100%, specificity 95.7% and positive predictive value of 27.2% and 100% negative. However, we recommend that individuals, who present values of alpha-1 antitrypsin in filter paper below the maximum value of the confidence interval (2.64 mg / dL), are investigated through more specific tests, ensuring greater reliability of the method.

Conclusion: In view of the excellent sensitivity and specificity the dried blood spot quantitative assay is a reliable screening tool for the detection of patients with alpha-1 antitrypsin deficiency. For the safety of not failing to diagnose a deficient individual we recommend that all individuals with values below the highest of the confidence interval value should be serum tested.

Figura 1	Estrutura da proteína alfa-1 antitripsina.....	20
Figura 2	Mecanismo pelo qual a AAT realiza a inibição de proteases (elastase neutrofílica).....	28
Figura 3	Mecanismo de formação de polímeros nos hepatócitos.....	29
Figura 4	Amostras de sangue no papel filtro.....	42
Figura 5	Imagem ilustrativa com o passo a passo dos procedimentos realizados para análise do sangue em papel filtro, desde a coleta do sangue até a sua análise no equipamento da SIEMENS BN II.....	44
Figura 6	Controles diários SL SIEMENS.....	45
Figura 7	Reagentes antissoro N para AAT da SIEMENS.....	46
Figura 8	Ilustração do equipamento SIEMENS BNII.....	48
Figura 9	Correlação entre as duas medidas de AAT sérica.....	53
Figura 10	Correlação entre as duas medidas de AAT no eluato de papel filtro....	53
Figura 11	Correlação entre as duas medidas de AAT no eluato em papel filtro em amostras sem turbidez.....	54
Figura 12	Correlação entre a AAT sérica e o eluato em papel filtro.....	54
Figura 13	Correlação entre a dosagem da alfa-1 antitripsina pelo eluato em papel filtro 36 e 12 horas após a sua preparação.....	56
Figura 14	Curva de característica de operação do receptor (ROC) do eluato de papel filtro para dosagem de AAT.....	58

Quadro 1	Relação entre o número de casos esperados e diagnosticados com deficiência de AAT(Pi ZZ e PiSZ).....	25
Quadro 2	Vantagens e desvantagens do uso do soro e papel filtro no teste para deficiência de AAT.....	34
Tabela 1	Características demográficas da amostra.....	52
Tabela 2	Dosagens do eluato do papel filtro 12 e 36 horas após sua preparação.....	55
Tabela 3	Pontos de corte pelo coeficiente de “ <i>Bootstrap</i> ”.....	57

AAT	Alfa-1 antitripsina
AIR	Registro Internacional de alfa-1 antitripsina
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BOLD	<i>Burden of Obstructive Lung Disease</i>
BD	Broncodilatador
CVF	Capacidade vital forçada
DBS	Dried Blood Spots
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
GOLD	Iniciativa Global para Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
IC	Intervalo de confiança
IEF	Focalização isoelétrica
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NHLBI	Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue dos Estados Unidos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Inibidor da proteinase
PKU	Fenilcetonúria
PLATINO	Projeto Latino-Americano de Investigação em Obstrução Pulmonar
ROC	Característica de operação do receptor
SERPINA	Inibidor de Proteinase Serina
SBPT	Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
VEF₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VEF1/CVF	Relação entre volume expiratório forçado no primeiro segundo e capacidade vital forçada

VPP	Valor predictivo positivo
VPN	Valor predictivo negativo

Sumário

Resumo.....	IX
Abstract.....	X
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Tabelas.....	XII
Lista de Abreviaturas.....	XIII
1. Introdução	17
1.1. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)	17
1.2. Deficiência de alfa-1 antitripsina	19
1.2.1. Aspectos epidemiológicos	22
1.2.2. Fisiopatologia.....	25
1.2.3. Manifestações clínicas.....	30
1.2.4. Testes diagnósticos	31
1.2.4.1 Testes quantitativos	32
1.2.4.2 Testes qualitativos	3535
2. Justificativa para a pesquisa.....	37
3. Objetivo	39
4. Métodos	40
4.1. Delineamento do estudo	40
4.2. Amostra estudada	40
4.3. Espirometria	41
4.4. Coleta das amostras de sangue.....	42
4.5. Análise das amostras de sangue	43
4.5.1. Preparação das amostras para análise	43
4.5.2. Calibração do equipamento.....	44
4.5.3. Controles diários.....	45

4.5.4. Técnica da análise da concentração de AAT	46
5. Análise estatística	49
6. Resultados	51
6.1. Amostra.....	51
6.2. Dados demográficos	51
6.3. Reprodutibilidade da alfa-1 antitripsina sérica e em papel filtro	52
6.4 Sensibilidade e especificidade do eluato.....	56
7. Discussão	59
8. Limitações	68
9. Conclusão	69
10. Referências bibliográficas	70
Anexos.....	76
Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	76
Anexo 2 - Curva de calibração do equipamento BNII.....	78
Anexo 3 - Controles diários do equipamento BNII.....	79
Anexo 4 - Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa	81

1. INTRODUÇÃO

1.1- *Doença pulmonar obstrutiva crônica*

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é definida como “uma doença evitável e tratável com alguns efeitos extrapulmonares significativos que podem contribuir para a gravidade em alguns pacientes. O componente pulmonar é caracterizado por limitação ao fluxo aéreo que não é totalmente reversível. A limitação ao fluxo aéreo é geralmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal do pulmão frente a partículas ou gases nocivos” (1).

A DPOC vem apresentando um aumento mundial significativo na sua prevalência e mortalidade. Estudos de prevalência sugerem que cerca de um quarto dos adultos fumantes com 40 anos ou mais venham a desenvolver leve limitação ao fluxo de ar. A DPOC é atualmente a quarta causa de morte no mundo, e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ela se torne a terceira maior causa em 2030, estando atrás somente das doenças cardíacas e do acidente vascular cerebral, sendo que estas apresentaram redução nos últimos anos, enquanto que a DPOC duplicou durante o mesmo período. (1, 2)

Há uma variação considerável na prevalência da DPOC, entre 5,5 a 20%, que pode ser explicada pela diversidade de métodos de pesquisa, critérios diagnósticos e a heterogeneidade dos sujeitos de pesquisa (3). Diante dessa variante foi desenvolvido o estudo *BOLD* (*Burden Obstructive Lung Disease*), com o objetivo de investigar com maior precisão a prevalência da DPOC. Os resultados desse estudo, numa avaliação realizada em 12 países, mostrou uma prevalência da DPOC (Estadio II ou >) de 10,1% para homens e 8,5% para mulheres (4). Esses resultados foram consistentes com os achados no estudo PLATINO, realizado em cinco países latino-americanos, onde as prevalências encontradas tiveram amplitude de 7,8% (Cidade do México) a 19,7% (Montevideo) (5). Esse estudo também avaliou a cidade de São Paulo, onde foi detectada 15,8% de prevalência de DPOC, sendo que apenas 12% dos casos tinham diagnóstico prévio de DPOC, enfisema ou bronquite (5). O resultado é coerente com o demonstrado por van den Boom e colaboradores, onde menos de 6% dos indivíduos tinham conhecimento do diagnóstico (6). A partir

desses achados é possível observar claramente o subdiagnóstico da DPOC na população geral.

A limitação crônica ao fluxo aéreo, medido pela espirometria, onde há redução do VEF1 (volume expiratório forçado no primeiro segundo), é decorrente de uma série de alterações frente à inflamação crônica das vias aéreas (1). A inflamação encontrada na DPOC é consequência da amplificação da resposta inflamatória normal das vias aéreas a gases nocivos, sendo a fumaça do cigarro o mais encontrado. O contato direto de gases nocivos com as células epiteliais das vias aéreas leva à liberação de mediadores inflamatórios locais, que são rapidamente identificados pelos receptores de reconhecimento padrão, principalmente pelo receptor *Toll-like*, e uma resposta inflamatória não específica é desencadeada. Secundariamente a esse processo é observado a liberação de citocinas (principalmente o fator de necrose tumoral α e interleucinas I e VIII), macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, que são recrutadas para comandar a resposta inflamatória. Esse processo produz enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio, que se não forem contrabalanceados pelas antiproteases e antioxidantes, podem causar danos irreversíveis ao epitélio pulmonar (7). Como consequência, é observado aumento da produção de muco, hiperplasia de células epiteliais e constante reparação tecidual, com posterior espessamento da parede das vias aéreas. A extensão da inflamação, fibrose e exsudatos luminal em pequenas vias aéreas estão correlacionadas com a redução do VEF1 e da relação do VEF1/CVF (capacidade vital forçada) e, provavelmente, com o decréscimo acelerado no VEF1, que é a principal característica da DPOC (8, 9).

Em decorrência a esse quadro pode-se encontrar duas condições do sistema respiratório em pacientes com DPOC, que contribuem diretamente para a limitação ao fluxo aéreo. A primeira delas é a bronquite crônica, caracterizada pela inflamação da parede das vias aéreas, associada com a hiperplasia das células caliciformes e o alargamento da submucosa traqueobrônquica e a hipersecreção de muco. A segunda é o enfisema com alterações microscópicas e macroscópicas, o qual levam à destruição elastolítica da parede alveolar, que é uma importante condição para a deterioração irreversível do fluxo de ar (2).

O mecanismo responsável pela amplificação da inflamação ainda não é bem conhecido, mas se sabe que há interação genética. A DPOC é considerada uma

doença poligênica, ou seja, há uma interação entre fatores ambientais e genéticos. Isto está bem claro, uma vez que se sabe que apenas 25-30% dos indivíduos fumantes irão apresentar declínio acelerado da função pulmonar, evidenciando que fatores genéticos podem influenciar quais fumantes irão desenvolver a limitação do fluxo aéreo (8). Existem alguns genes que têm sido ligados a DPOC, mas o fator genético mais importante e estabelecido é a deficiência de alfa-1 antitripsina, que é estimada em 1-2% dos pacientes com DPOC, estando associada ao enfisema de início precoce, principalmente se há associação com o tabagismo (10, 11). Em países industrializados, o tabagismo é responsável pela maioria dos casos de DPOC. Entretanto, nos países em desenvolvimento outros fatores ambientais, como a exposição ocupacional a poeiras e a queima de combustível de biomassa, são importantes. Há ainda os fatores ambientais que não aparentam risco significativo para o desenvolvimento da doença, mas podem influenciar na sua gravidade. Trata-se dos poluentes ao ar livre e a exposição ao fumo passivo. Existem também os fatores de risco que não podem ser modificados, que incluem idade, sexo, comorbidades e infecções respiratórias de repetição na infância ou idade adulta (1). É provável que existam interações importantes entre fatores ambientais e predisposição genética à DPOC (12).

1.2- *Deficiência de alfa-1 antitripsina*

A deficiência de alfa1- antitripsina (AAT) é uma condição genética descoberta em 1963 por Carl-Bertil Laurell e Sten Eriksson, que ao analisarem amostras de proteínas séricas, através da eletroforese em gel, notaram a ausência da banda correspondente à globulina alfa-1 de 5/1500 amostras (13). Em outra análise, os autores identificaram que três dos cinco indivíduos apresentavam enfisema pulmonar de início precoce. Subsequentemente, outras associações relacionadas foram identificadas, tais como hepatite neonatal, cirrose hepática e carcinoma hepático (14). Essa condição genética também tem sido relacionada com asma, bronquiectasia, paniculite e vasculite (15-17). Após a descrição dos primeiros casos e início do reconhecimento da doença, grandes avanços em âmbito de pesquisa têm sido realizados para compreensão dos mecanismos moleculares das alterações genéticas envolvidas em sua gênese (18).

A AAT é uma glicoproteína de fase aguda sintetizada pelos hepatócitos e, posteriormente, secretada para o plasma. É produzida também, porém em pequenas quantidades, pelos macrófagos alveolares, monócitos e por células epiteliais pulmonares (19-21). A figura 1 mostra a estrutura da AAT, destacando as folhas tridimensionais β e o centro móvel (metionina), que atua como um sítio de ligação para a protease alvo (22).

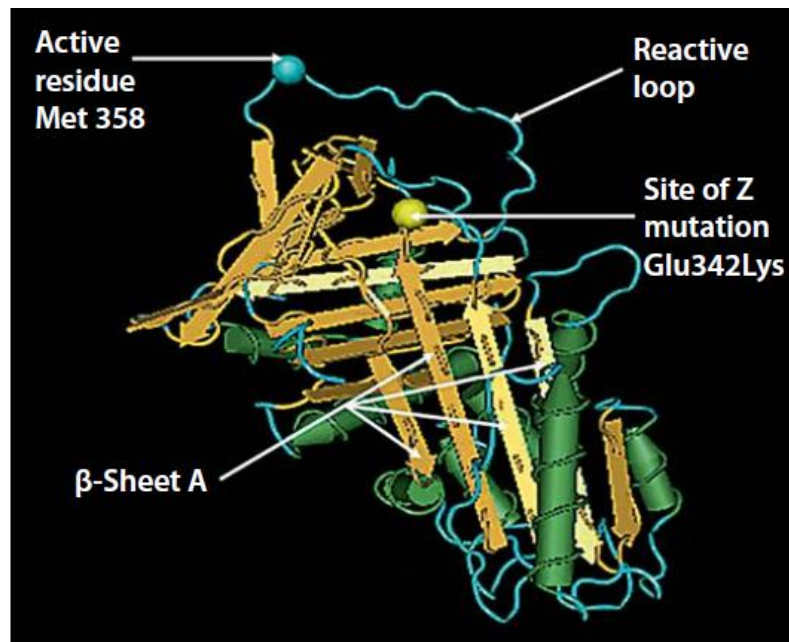


Figura 1: Estrutura da proteína alfa-1 antitripsina. (Retirada de Wood e colaboradores (22))

Para a AAT a protease alvo é predominantemente a elastase neutrofílica, embora também possa se ligar a outras proteinases, tais como a proteinase 3 e a catepsina G (23). Algumas mutações no centro móvel da AAT podem levar à polimerização da proteína dentro dos hepatócitos, fazendo com que a AAT não seja secretada de maneira eficiente no plasma. Isso resulta em baixos níveis de proteína no interior do pulmão e propicia maior ação elastolítica da elastase neutrofílica. Essas mutações são causadas por polimorfismos genéticos codominantes, definidos de acordo com alelos específicos (24).

A deficiência de AAT é uma desordem autossômica codominante, altamente polimórfica, com mais de 120 mutações alélicas já identificadas (25). A proteína de AAT é codificada pelo gene SERPINA1 (inibidor de proteinase serina), anteriormente conhecido como gene inibidor da protease (PI), localizado no braço longo do cromossomo 14q31-32 (26). Os fenótipos são classificados por um sistema de

codificação, onde os alelos herdados são geralmente letras, as quais significam a velocidade de migração da molécula sobre um gradiente de pH isoelétrico de A (para variantes com migração mais rápida) para Z (variantes com migração mais lenta) (27). O fenótipo MM indica indivíduos homozigotos para o alelo M (normal) e ZZ os que são homozigotos para o alelo Z, que é a deficiência mais grave e mais comum, sobre a qual é observado concentrações séricas de AAT inferiores a 50 mg/dL (aproximadamente 10-15% do normal), com risco significativamente aumentado de doenças pulmonares e hepáticas (10).

Apesar da deficiência de AAT afetar menos do que 1% da população mundial, ainda assim pode estar entre as afecções hereditárias mais comuns em todo mundo. A deficiência de AAT normalmente apresenta manifestações clínicas como o enfisema de início precoce, mesmo em não fumantes (28). Outros problemas de saúde incluem cirrose, doença cardiovascular e paniculite (10). Desse modo, o diagnóstico precoce é fundamental para o prognóstico da doença e para um maior entendimento acerca da mesma, porém na prática ainda observa-se casos que permanecem subdiagnosticados (29). Em uma pesquisa com 300 indivíduos homozigotos para o alelo PiZ, o alelo responsável pela condição mais grave de deficiência de AAT, os pacientes relataram uma lacuna de mais de cinco anos entre a ocorrência do primeiro sintoma até o diagnóstico correto. Ainda nesse estudo, foi observado que 43% dos pacientes relataram ter consultado no mínimo três médicos antes de receberem o diagnóstico (30).

Em um estudo realizado por Stoller e colaboradores, foi observado o banco de dados de 1.129 indivíduos do *National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI)*, os quais apresentavam deficiência grave de AAT. Nesse estudo foi encontrada uma taxa de mortalidade de 18,1%, sendo o enfisema e a cirrose as causas mais comuns de morte (72% e 10%, respectivamente). Diante da análise dos dados, os pesquisadores concluíram que a deficiência grave de AAT representa uma ameaça significativa à saúde do indivíduo (31).

1.2.1 Aspectos epidemiológicos

Dois aspectos sintetizam a epidemiologia da deficiência de alfa-1 antitripsina: primeiro, é um distúrbio relativamente comum; e segundo, que é subdiagnosticado na prática clínica (10).

Europeus caucasianos e da América do Norte têm as maiores prevalências de deficiência de AAT no mundo. Entretanto, o número de pacientes identificados é menor do que a estimativa de prevalência com base nas frequências alélicas (32). Esse fato pode ser atribuído a dois fatores: em primeiro lugar, é estimado que 10 – 35% dos indivíduos com genótipos homozigotos ZZ são assintomáticos (33); em segundo lugar, um grande número de pacientes afetados são erroneamente classificados como asmáticos ou portadores da doença pulmonar obstrutiva crônica (6, 34, 35).

Como discutido acima, a maioria dos indivíduos com essa doença estão subdiagnosticados e o atraso para o diagnóstico é comum. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o delineamento de programas de rastreamento para pacientes com deficiência de AAT são divididos em três grandes grupos: triagem de indivíduos adultos normais; rastreio de indivíduos da população de risco; e, por fim, programas de triagem neonatal (36).

A triagem, quando realizada na população geral, é considerada extremamente útil para determinar a prevalência da deficiência de AAT não diagnosticada na comunidade, porém seu rendimento é baixo e possui relação de custo-efetividade reduzida (37). Essa forma de triagem foi empregada por Silverman e colaboradores em 20.000 doadores de sangue, sendo identificados sete indivíduos com a mutação alélica PI*Z (8). O rastreio a grupos de risco tem sido amplamente utilizado para minimizar a situação de subdiagnóstico da doença. Esses grupos envolvem indivíduos adultos com problemas respiratórios como a DPOC e asma, sendo incluídos também parentes de pacientes diagnosticados com deficiência de AAT. Esses estudos podem contribuir indiretamente para a estimativa da prevalência de deficientes de AAT. Segundo o *National Health Information Survey* (NHIS), estima-se que 3,1 milhões de americanos tenham DPOC, baseado nesses dados, Lieberman e colaboradores, avaliaram uma amostra de 965 pacientes com DPOC nos Estados Unidos, e encontraram a prevalência da deficiência de AAT de 1,9%

(38). A partir deste índice de prevalência pode ser estimado que, aproximadamente, 60.000 indivíduos americanos sejam portadores da deficiência de alfa-1 antitripsina, entretanto, menos de 10.000 já foram realmente identificados (10).

Desde março de 1991, o Deficiency Detection Center, em Salt Lake City, nos Estados Unidos, oferece testes gratuitos para pacientes com DPOC, asma e indivíduos com história familiar de deficiência de AAT. Em cinco anos de análises, 16.748 amostras foram analisadas, destas 515 indivíduos foram diagnosticados com deficiência, correspondendo a 3,1% das amostras. Estima-se que esse programa já tenha identificado 15% dos indivíduos com deficiência de AAT, nos Estados Unidos (36).

É recomendado pela OMS que o teste de AAT deva ser incluído nos programas de rastreamento neonatal. Estes programas têm como principal objetivo a detecção precoce, possibilitando, assim, a implantação de medidas preventivas, incluindo, principalmente, o tabagismo (36). Os maiores programas de rastreamento neonatal foram realizados na Suécia e em Oregon nos Estados Unidos, avaliando 200.000 e 107.038 recém-nascidos, respectivamente. O estudo sueco identificou 122 neonatos com fenótipo PI^*ZZ , 48 com PI^*SZ e um com PI^*SS , ou seja, 1 a cada 1.639 (39). Já no estudo realizado em Oregon a frequência da mutação homozigótica $PiZZ$ foi três vezes mais baixa, com a estimativa de prevalência de 1 para 5.097 (40).

Em uma pesquisa de meta-análise realizado na Espanha, foram analisados quatro estudos de prevalência de deficiência de AAT e estimado que cerca de 1,2 milhões sejam portadores do alelo Z entre os 40 milhões de habitantes (3% da população) e, aproximadamente, 12.000 deles sejam homozigotos $PiZZ$ com deficiência grave. Em relação à frequência alélica dos pacientes, foi observado que o mais frequente foi o $PiMS$ (80%), seguido de $PiMZ$ (13%), $PiSS$ (4,7%), $PiSZ$ (1,6%) e $PiZZ$ (0,1%). No mesmo estudo, as estimativas em relação ao fenótipo $PiZZ$ indicaram que poderiam haver 2.526 adultos com DPOC e 4.030 indivíduos (crianças e adultos) com doença hepática crônica, associada com esse fenótipo (41).

Em uma revisão entre 373 grupos de deficiência de alfa-1 antitripsina em 58 países, de Serres estimou que 3,4 milhões de pessoas em todo o mundo

apresentem o fenótipo ZZ, SZ, ou SS (34). Com base nos resultados do Registro Internacional de Alfa-1 (AIR), Luisetti e Seersholm estimaram que, aproximadamente, 79.456 pessoas, no Reino Unido, tenham deficiência de AAT com o fenótipo ZZ e SZ, e 305.009 em oito países (Canadá, Itália, Holanda, Nova Zelândia, Austrália, Espanha, Suécia e Reino Unido) (37).

A maior prevalência da variante PI*Z foi registrada no norte e oeste de países europeus, sendo mais evidente no sul da Escandinávia, Dinamarca, Holanda, Reino Unido e norte da França (34). No sul da Europa ocorre uma prevalência maior de P*iS, e observa-se um valor máximo na Península Ibérica (Espanha e Portugal). Embora essa condição muitas vezes seja considerada uma desordem rara é, atualmente, a mais comum dos estados de deficiência herdados no hemisfério ocidental, tratando-se, portanto, de uma aparente contradição com o subdiagnóstico generalizado (42). Dados revelam que a prevalência da deficiência de AAT é tão comum quanto a fibrose cística, que tem a taxa de prevalência em caucasianos de 1 em 1.700 a 1 em 6.500 (43).

Em vista das estimativas apresentadas, está claro que a deficiência de AAT é uma condição subdiagnosticada. Na tentativa de minimizar os fatos, a OMS tem incentivado programas de rastreamento para conseguir implantar um registro nacional. Em resposta a essa orientação, em 1997 a comunidade científica desenvolveu um registro internacional – AIR de indivíduos portadores dessa condição, abrangendo diversos países (42). Apesar das tentativas para aumentar a detecção da doença, o subdiagnóstico continua evidente como mostra o quadro 1.

Quadro 1. Comparação entre o número de casos esperados e diagnosticados com DATT (PiZZ e PiSZ)

Países	Número de indivíduos esperados com DAAT	Numero de indivíduos diagnosticados com DAAT
Canadá	42372	144
Itália	46068	100
Alemanha	9790	136
Nova Zelândia/Austrália	33707	93
Espanha	86899	90
Suécia	6717	181
Reino Unido	79456	324
Total	305009	1068

Os casos esperados baseiam em: Serres et al., 2002 e Marin et al., 1976. Os casos diagnosticados foram retirados do Registro Internacional Alfa-1 antitripsina (AIR). Adaptado da referência (37)

1.2.2 Fisiopatologia

Alfa-1 antitripsina é uma glicoproteína de fase aguda, sintetizada no fígado, estando disponível no plasma em uma concentração de 1,5-3,5 g / litro. A proteína de AAT possui 394 aminoácidos, contendo um centro móvel ativo, a metionina na posição 358 (figura 1) (22). Ela é codificada pelo inibidor da proteinase (Pi), no locus do cromossomo 14q (26). O locus Pi, também conhecido como SERPINA1 (SERina Proteinase Inbidor), tem 12,2 kb de extensão, sendo composto por quatro regiões de codificação (2, 3, 4 e 5) e três regiões não codificáveis (1a, 1b, 1c) (44).

A AAT é sintetizada principalmente no fígado, mais especificamente no retículo endoplasmático rugoso dos hepatócitos, mas também é produzida, em menor quantidade, por macrófagos e células epiteliais pulmonares (19-21). É um gene altamente polimórfico, com 120 mutações notificadas em bases de dados publicados, cada um com um tipo de variação alélica (25).

As variantes são classificadas por meio da velocidade de migração em eletroforese em gel, como F (*fast* – rápido), M (*medium* – médio), S (*slow* – lento) e Z (*very slow*- muito lento). Essa alteração encontrada na velocidade de circulação da proteína através de um gel ocorre em função da mudança na composição dos

aminoácidos, que interfere na sua carga proteica (45). A maioria dos indivíduos são homozigóticos PiM, sendo as mutações clinicamente mais comuns, a variação PiZ, onde ocorre a substituição da lisina pelo glutamato na posição 342 da sequência de aminoácidos, outra mutação comum é a PiS, onde há a substituição do aminoácido valina pelo glutamato na posição 264, que resulta em uma redução de 40% das concentrações de AAT circulantes (11). O resultado dessas mutações é a inserção de códons de parada prematuros que resulta em alterações na estrutura terciária da molécula. O alelo PiZ é a variante mais prevalente em países do norte da Europa e o alelo S no sudoeste da Europa (11, 37).

As variantes também podem ser classificadas de acordo com o nível e o status funcional de AAT circulante em: normal, deficiente, nulo ou disfuncional. Os indivíduos portadores da deficiência de AAT são mais propensos às doenças hepáticas e pulmonares, enquanto que os portadores de alelos nulos somente à doença pulmonar. Já os alelos disfuncionais são caracterizados por uma alteração no gene ou na tradução, onde ocorre a síntese da proteína (AAT), e esta alteração faz com que a AAT perca sua funcionalidade (10, 18).

A primeira vez que foi descrita a atividade do inibidor de protease no plasma humano foi em 1894 por Fermi e Pernossi. Entretanto o isolamento e a caracterização da proteína foram observados anos depois após a disponibilidade de novas técnicas. Em 1955 a proteína foi isolada pela primeira vez e nomeada de alfa-1 antitripsina devido a sua capacidade de inibir a tripsina (46). Após alguns anos foi descoberto que a AAT tinha como função a inibição de outras proteinases, sendo a principal delas a elastase neutrofílica (10, 21). Esta proteína pertence à classe dos inibidores de proteinase ou SERPINA1, que é membro da superfamília dos inibidores de protease (47).

Conhecer o mecanismo de inibição da protease fornece uma compreensão clara acerca da fisiopatologia da deficiência de AAT. As serpinas adotam uma conformação metaestável composta por nove α -hélices, três folhas beta (A – C) e um centro móvel reativo, a metionina, que funciona como uma “isca” para a elastase neutrofílica (figura 1). Esse centro móvel é formado por 20 aminoácidos, atuando como um pseudossustrato para a protease alvo (figura 2). A elastase neutrofílica (protease) se liga ao centro móvel da AAT, formando uma ligação éster entre a

protease e a alfa-1 antitripsina. Esse processo é seguido por uma alteração conformacional, que inverte o polo superior da elastase neutrofílica para o polo inferior da AAT, essa alteração aumenta a estabilidade da AAT (figura 2) (48, 49). Em seguida a protease é clivada contra o polo inferior da AAT, que imediatamente altera a tríade catalítica e inativa a enzima, sendo posteriormente eliminada pela circulação sanguínea. Esse processo é simultaneamente suicida, isto é, ocorre à destruição das duas moléculas envolvidas, por isso normalmente existe excesso de AAT no pulmão, o que garante uma defesa adequada contra a elastase neutrofílica (50, 51). O formato e a disposição das folhas β da AAT são essenciais para realização da sua função antiprotease. No entanto, algumas mutações genéticas podem alterar o seu estado conformacional e desestabilizar a proteína, permitindo, assim, a inserção de outra molécula de AAT, e assim consecutivamente, o que leva a um sequenciamento com várias moléculas de AAT, resultando na formação de um polímero, os quais ficam retidos no interior das células hepáticas (52). Esse processo pode resultar em doenças hepáticas, em decorrência do acúmulo da proteína dentro dos hepatócitos. Assim, as mutações que favorecem a formação de polímeros desencadeiam as doenças hepáticas, enquanto que a redução da disponibilidade de AAT plasmática aumenta a suscetibilidade a doenças pulmonares (53, 54).

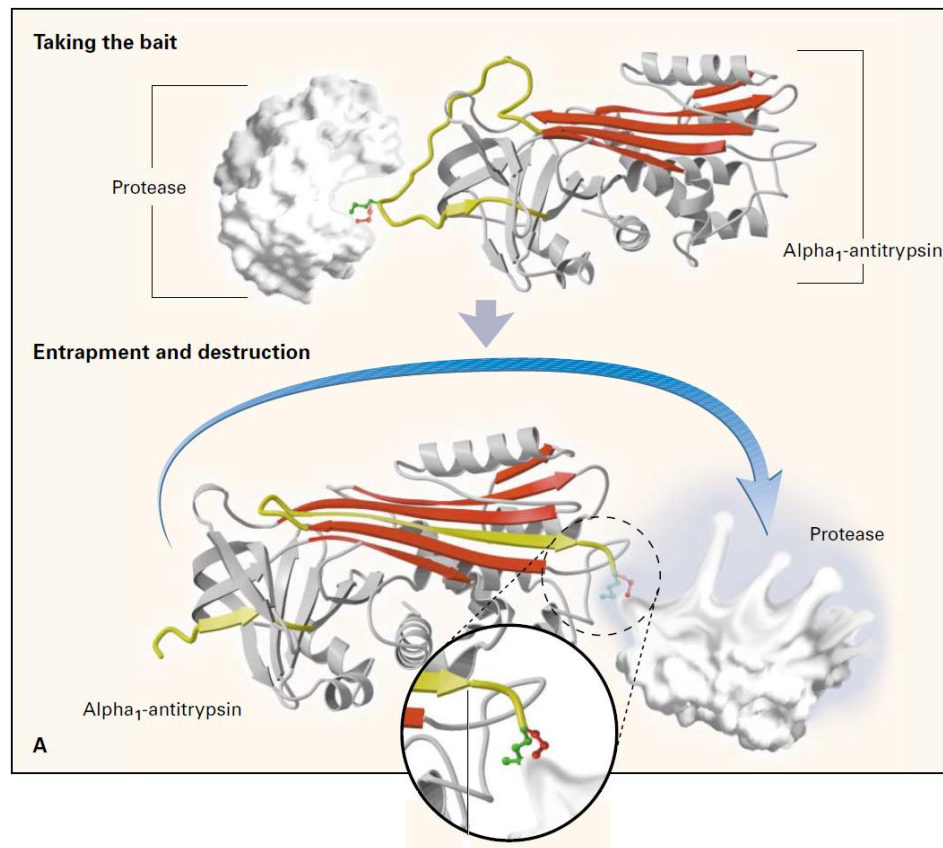


Figura 2: Mecanismo pelo qual a AAT realiza a inibição de proteases (elastase neutrofílica). Primeiramente ocorre o encaixe entre a AAT e a protease através do centro reativo (metionina), seguido da alteração conformacional das duas moléculas, com posterior inativação simultânea. (Adaptada de Carrell e Lomas, 2002 (55)).

A mutação Z da AAT ocorre no aminoácido de posição 17 (17 aminoácido proximal ao centro reativo P1). Essa alteração abre as folhas β , favorecendo a inserção de uma segunda molécula de AAT e formando um dímero (D) (fig. 3). Esse processo pode se estender para formar polímeros (P), que irão permanecer retidos no interior do retículo endoplasmático do hepatócito, impossibilitando a sua função, bem como o seu transporte para a corrente sanguínea (figura 3). O apoio a essa teoria deve-se ao fato de que, quando purificada e incubada sobre condições fisiológicas a AAT com a mutação PiZ forma cadeias de polímeros de proteínas (56).

Na figura 3 é representada a mudança conformacional da AAT no caso da mutação PiZ para uma forma poligênica monomérica (M^*), onde ocorre a abertura das folhas β , que favorece dois desfechos: a ligação de outra molécula de AAT formando um dímero e, posteriormente, a ligação de outras moléculas de AAT resultando em um polímero; ou na forma estável monomérica latente (L), onde a

molécula se liga no seu próprio loop (alça) (47). Na mutação PiZ aproximadamente 85% das moléculas sintetizadas no fígado sofrem a polimerização e acumulam-se no retículo endoplasmático rugoso das células hepáticas. Assim, apenas 10-15% das moléculas da proteína são liberadas para o sangue. Sabendo da importante função como antiprotease da AAT, os pacientes possuem uma proteção cinco vezes menor contra a elastase neutrofílica, ficando suscetível a alterações pulmonares. Enquanto a polimerização nos hepatócitos pode resultar em lesão celular com posterior morte celular, aumentando a susceptibilidade de cirrose hepática (56). Com uma menor concentração de AAT circulante é observado um desequilíbrio entre proteases e antiproteases no pulmão. A maioria das proteases ativas podem progressivamente levar à destruição da matriz do epitélio pulmonar, das estruturas alveolares e dos vasos sanguíneos. Com o passar dos anos, tal destruição pode resultar em enfisema pulmonar e bronquite crônica (57).

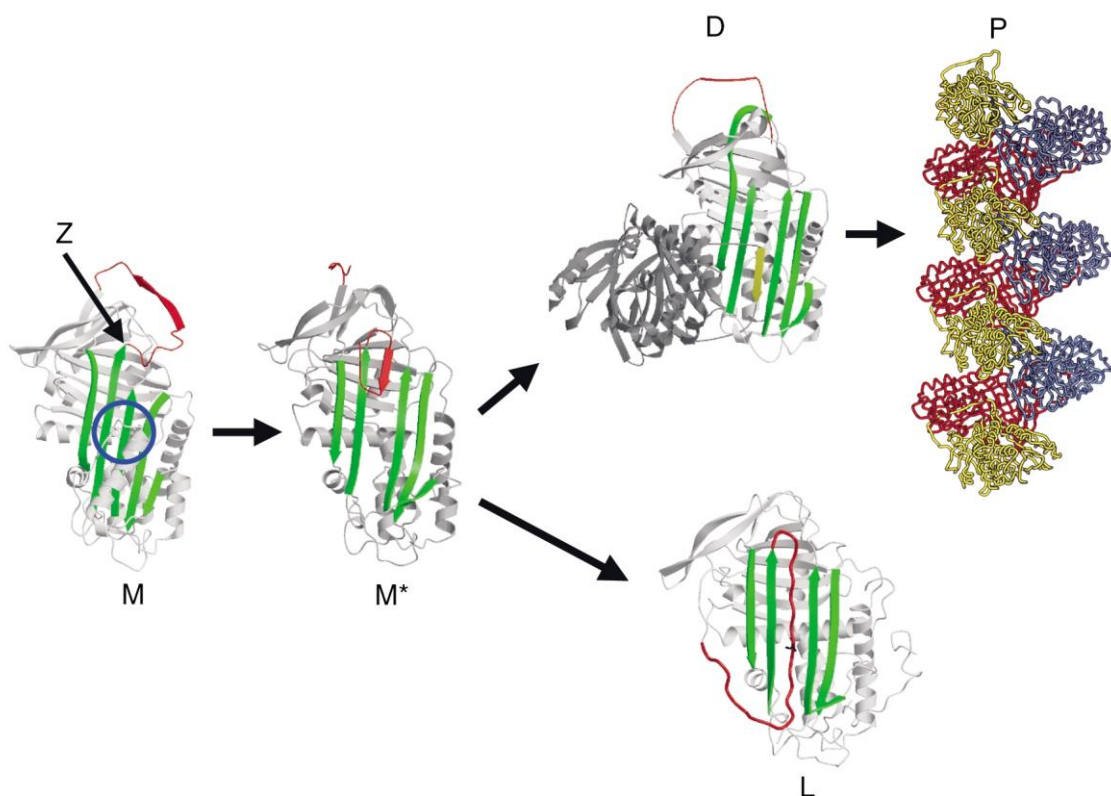


Figura 3: A figura acima está representando em verde as folhas β A e em vermelho o centro reativo. O esquema demonstra a formação de polímeros resultante da mutação Z (indicada pela flecha) onde ocorre a abertura das folhas A favorecendo à inserção de outra molécula com a formação de um dímero (D), que pode se estender a um polímero (P), ou então na sua conformação latente (L) onde a molécula se liga no seu próprio loop (alça). (Retirada de Lomas e Mahadeva, 2002 (47)).

Além do seu potente efeito antiprotease a AAT parece desempenhar outros papéis importantes na regulação de processos inflamatórios no pulmão, como estimular a reparação tecidual, inibir respostas imunológicas e desempenhar atividade antimicrobiana. Entretanto, tais funções ainda precisam de maiores estudos para comprovação científica (58). Além da polimerização encontrada nos hepatócitos, há evidências de que ocorra também a aglomeração da AAT em tecidos periféricos, como no pulmão. Como já supracitado, a produção de AAT não ocorre somente nos hepatócitos, mas também nos macrófagos, neutrófilos e algumas células do epitélio pulmonar, o que levou alguns autores a descobrir grandes quantidades de polímeros de AAT em fluidos bronco alveolares. Em razão disso, é possível que a capacidade antiproteolítica do pulmão possa ser mais reduzida nesses indivíduos, pois essas macromoléculas promovem o desencadeamento de processos inflamatórios no pulmão. Atualmente, o conhecimento é restrito em relação à magnitude desses efeitos pró-inflamatórios, mas há evidências que a conversão da AAT de um monômero (proteína) para um polímero pode transformar a sua função de anti para pró-inflamatória (47).

1.2.3 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas podem ser apresentadas por pacientes com variantes nulas e também nas variações alélicas PiZ e PiS homozigóticos, ocorrendo manifestações pulmonares ou hepáticas. Os heterozigotos, ou seja, portadores de um alelo normal e um alelo mutante (PiMZ ou PiMS), dificilmente irão desenvolver sintomas clínicos. A maior parte dos pacientes sintomáticos apresentam como manifestação dominante a doença pulmonar, que tem como característica o início precoce, com progressão rápida, principalmente se há a presença de fatores de risco adicionais, tais como o tabagismo e a exposição a poluentes ambientais (21).

As manifestações pulmonares podem ser esperadas quando a concentração sérica de AAT é inferior a 35% do valor previsto, sendo a DPOC a mais encontrada nesses indivíduos (54). Os sintomas pulmonares mais frequentes são: tosse, expectoração e dispneia; que podem aparecer entre a terceira e a quarta década de vida. Aproximadamente 60% dos não fumantes com fenótipo PiZZ desenvolvem

sintomas pulmonares na quarta década de vida e 90% na quinta década. Contudo o início dos sintomas em fumantes é mais precoce. Consequentemente, em muitos casos é difícil diferenciar a DPOC secundária da deficiência de AAT, mas exames como o RX e a tomografia de tórax irão mostrar uma característica típica dessa condição, que é o enfisema basal com distribuição paracinar, podendo ajudar no diagnóstico (11, 59). Entretanto, é importante lembrar que é recomendado pela OMS e *American Thoracic Society/ European Respiratory Society (ATS/ERS)* a realização de testes diagnósticos para essa condição em todos os pacientes com DPOC. A bronquiectasia também pode ser encontrada em 25% dos casos, percentual semelhante ao encontrado em paciente com DPOC (60). A função pulmonar pode variar entre os diferentes indivíduos, mas a maioria dos pacientes apresentam distúrbios obstrutivos com um declínio mais acentuado do VEF1 e da relação VEF1/CVF. Em pacientes com fenótipo PIZZ a taxa de declínio do VEF1 é de, aproximadamente, 45 ml/ano entre não fumantes e cerca de 70 ml/ano em fumantes. A hiper-reatividade brônquica está presente em cerca de 20% dos pacientes e é associada com pior prognóstico (27).

1.2.4 Testes diagnósticos

Quando há a suspeita da deficiência de AAT, o paciente deve realizar alguns testes específicos, incluindo a quantificação sérica de AAT e testes genéticos (18). Aproximadamente 1-2% dos pacientes com DPOC apresentam deficiência de AAT, porém na maioria das vezes essa condição ainda não é investigada (38). No último documento sobre a conduta em pacientes com deficiência de AAT a *American Thoracic Society / European Respiratory Society* recomendaram fortemente a realização de testes diagnósticos em pacientes com DPOC ou asma, familiares de pacientes afetados, como também indivíduos com cirrose hepática de origem idiopática ou paniculite necrosante (18). O diagnóstico laboratorial dessa condição é baseado na avaliação quantitativa da concentração de AAT plasmática e na identificação de um fenótipo. As concentrações de AAT podem ser medidas no soro ou em gotas de sangue sobre um papel filtro específico (61).

Existem três métodos que são comumente utilizados para o diagnóstico da deficiência de AAT: quantificação da AAT sérica, fenotipagem e genotipagem da AAT. A medida dos níveis séricos da AAT é um método quantitativo, pode ser realizado através da imunodifusão radial, imunonefelometria e a imunoeletroforese. É uma técnica amplamente utilizada, porém existem duas implicações relacionadas. Primeiro, a AAT é uma proteína de fase aguda, e seus níveis podem aumentar substancialmente em decorrência de processos inflamatórios. Segundo, a técnica de imunonefelometria pode sofrer interferência de lipídios e hemoglobina, superestimando seus resultados. Portanto, deve-se ter cuidado ao utilizar esse método isoladamente como diagnóstico. Caso o nível de AAT no soro for abaixo do esperado, é recomendada a fenotipagem ou a genotipagem para confirmação diagnóstica e identificação do fenótipo/genótipo (62). A fenotipagem e a genotipagem alelo específica identifica as mutações alélicas mais comuns, sendo elas PiZ e PiS, mas elas não identificam as mutações raras, pois essas variantes não produzem a proteína. Assim, quando é observada uma discrepância entre os resultados encontrados na fenotipagem e na quantificação sérica é recomendada a análise de sequenciamento genético (63, 64).

1.2.4.1 Testes quantitativos

Os níveis de AAT no soro podem ser determinados através da imunodifusão radial, imunoeletroforese ou por imunonefelometria. Atualmente, a imunonefelometria é o método mais utilizado, sendo seu manuseio relativamente simples e de baixo custo. Nesse método é emitido um feixe de luz intensa na amostra que contém uma reação antígeno e anticorpo. Ao entrar em contato com essas moléculas, a luz é refletida e captada por um fotômetro, sendo a intensidade da radiação refletida proporcional à quantidade de antígeno presente na amostra. Esse método é baseado na formação de complexos imunes entre a proteína de AAT e anticorpos anti-AAT.

Para a correta interpretação dos resultados é recomendado que cada laboratório tenha o valor de normalidade da concentração de AAT a partir de um grupo controle. Os níveis de AAT podem ser expressos de duas formas, em microgramas por decilitro (mg/dl) ou micromoles ($\mu\text{mol/l}$ ou μM), dependendo da

técnica utilizada. Os valores de referência de AAT variam entre 100 – 200 mg/dL (27, 61). A quantificação dos níveis séricos de AAT é fundamental para o diagnóstico dessa deficiência, especialmente para triagem. Valores abaixo de 35% da normalidade é indicativo de um possível fenótipo PiZZ. Ao interpretar os resultados da técnica qualitativa isoladamente, é importante lembrar que a AAT é uma proteína de ação anti-inflamatória de fase aguda e que processos infecciosos ou inflamatórios podem alterar os resultados, elevando os níveis da AAT e mascarando os pacientes com deficiência intermediária (54). Em um estudo realizado recentemente foi observado que 80% dos pacientes, que eram deficientes intermediários e tinham a proteína C reativa acima de 0,8, apresentaram valores normais de AAT sérica (65). Concentrações elevadas de AAT também foram relatadas durante a gravidez e com o uso de anticoncepcionais orais. Consequentemente, o diagnóstico de deficiência de AAT deve basear-se tanto nos valores séricos da AAT quanto na identificação do fenótipo do paciente.

O método imunonefelometria pode ser realizado tanto no soro quanto em amostras de sangue em papel filtro (*DBS - dried blood spots*), sendo este amplamente utilizado para estudos de rastreamento, pois é uma técnica minimamente invasiva, de fácil armazenamento e que permite o seu transporte de diferentes regiões para o laboratório central, sem ter necessidade de técnicas complexas e de alto custo para a conservação das amostras. Além disso, esse método de amostragem pode ser também utilizado para realização da fenotipagem e genotipagem, caso seja necessário (66). No quadro 2 estão listadas as vantagens e desvantagens das duas técnicas de amostragem atualmente disponíveis, no soro e o papel filtro.

Quadro 2: Vantagens e desvantagens do uso do soro e papel filtro no teste para deficiência de AAT

	Vantagens	Desvantagens
Soro	<p>A amostra em sangue colhida com tubo de EDTA é de mais fácil manuseio em laboratórios</p> <p>Os médicos se sentem mais confortáveis com esse método, pois é o método convencional</p>	<p>Necessidade de punção venosa</p> <p>Potencial risco biológico</p> <p>Necessidade de acondicionamento e transporte para laboratórios, sendo uma importante barreira para estudos de triagem</p>
Papel filtro	<p>Fácil transporte de amostras</p> <p>Necessita de menor quantidade de sangue</p> <p>Os próprios pacientes podem enviar amostras</p> <p>Procedimento rápido, custo-efetivo, ideal para triagem</p>	<p>Em alguns casos pode não ter amostra suficiente para a realização do teste</p> <p>Manuseio mais difícil quando comparado com o plasma</p>

Adaptado de Ferrarotti e colaboradores, 2007 (61).

A técnica de papel filtro já foi validada previamente em países como, Espanha e Itália, mostrando-se altamente reprodutível e confiável quando comparada com a técnica padrão, o plasma ($r^2 = 0,86$ e $0,90$, respectivamente) (67, 68). Programas de rastreamento para detecção da deficiência de AAT utilizando a técnica de papel filtro têm sido amplamente utilizados, em diversos países, em pacientes com DPOC. Além disso, a amostra de sangue obtido no papel filtro já foi validada e tem sido utilizada com sucesso na realização da genotipagem alelo específico (PiS; PiZ), mostrando boa correlação quando comparada com a reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA (27, 68).

Essa técnica representa uma excelente alternativa para realização de programas de triagem, minimizando a condição subdiagnóstica da deficiência de AAT (27). A sua utilização permite o diagnóstico precoce dessa alteração genética, e a possibilidade de intervenções precoces para ajudar os indivíduos fumantes a parar (uma vez que a cessação do tabagismo é um fator determinante no prognóstico da doença), tratar os sintomas de enfisema e exacerbações, bem como realizar exames familiares para garantir o diagnóstico precoce de outros casos, e com isso realizar aconselhamento genético. Em alguns casos a terapia de reposição de alfa-1 antitripsina também pode ser iniciada (27, 69).

1.2.4.2 Testes qualitativos

O protocolo laboratorial mais comum para o diagnóstico da deficiência de AAT incluem a quantificação sérica da AAT e a focalização isoelétrica (IEF) das proteínas plasmáticas. No último documento da *ATS/ERS* publicado em 2003, a focalização isoelétrica foi considerada como o padrão ouro para o diagnóstico da deficiência de AAT. Entretanto, estudos mais recentes recomendam a utilização da genotipagem uma vez que é considerado um método mais sensível, específico e de fácil interpretação. A focalização isoelétrica utiliza a eletroforese para separar as proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico sobre um gel de acrilamida com um pH de 4,2 a 4,5 (18). Já a genotipagem é realizada através da PCR, podendo ser alelo específica, ou seja, determina os alelos mutantes mais comuns como PiS e PiZ ou também realizado o sequenciamento genético que irá determinar qualquer alelo mutante, inclusive, nulos e raros. A determinação do fenótipo é recomendada para confirmar o diagnóstico de deficiência de AAT em casos de pacientes com baixos níveis de AAT plasmático (61).

A análise molecular do gene de AAT é padrão ouro para a identificação de mutações alélicas raras e nulas. É recomendado quando é encontrada uma discrepância entre os resultados da AAT plasmática e a fenotipagem, por exemplo, baixos valores de AAT plasmática, porém com fenótipo normal, PiMM. Nesse caso, é realizado o sequenciamento genético da proteína através da amplificação do gene pela PCR. Portanto, para fins práticos, a detecção dessas mutações, juntamente com a quantificação sérica de AAT, parece ser eficiente em programas de detecção de pacientes (18).

A fenotipagem e a genotipagem são métodos complementares, tendo cada um a sua vantagem e desvantagem. No caso da fenotipagem, podem ser identificadas diferentes mutações, porém esse método é, particularmente, demorado e requer experiência e conhecimento para interpretar os resultados. Além disso, não existem controles e reagentes específicos para focalização isoelétrica. A genotipagem dirigida para alelos PiS e PiZ é tecnicamente mais fácil, entretanto, é detecta apenas os alelos específicos (mais comuns) (61).

Snyder e colaboradores avaliaram 512 pacientes com a finalidade de identificar qual é o método mais indicado para o diagnóstico da deficiência e

realizaram a genotipagem alelo específica (PiS e PiZ), fenotipagem e a quantificação da AAT sérica. Foi observado que em 96% dos casos os resultados foram concordantes. Apenas em 10 casos houve discordância entre os dois testes, sendo que em sete houve algum erro na fenotipagem, e na maioria das vezes encontraram dificuldades para a interpretação (64). Esses resultados foram concordantes aos encontrados por Bornhorst e colaboradores, onde foi detectada a discrepância entre três resultados, onde a IEF não foi bem sucedida em decorrência da hemólise presente na amostra (70). Os autores concluíram que os dois métodos são amplamente reproduzíveis, porém a genotipagem foi mais específica. Por fim, considerou-se que a fenotipagem é uma boa ferramenta para o diagnóstico, porém se os resultados encontrados não forem conclusivos ou inconsistentes com os achados clínicos deve-se optar pela genotipagem.

2. JUSTIFICATIVA PARA A PESQUISA

A DPOC é caracterizada por uma obstrução lenta e progressiva do fluxo aéreo, devido à perda da elasticidade e à destruição do parênquima pulmonar e obstrução das vias aéreas periféricas (71). Apesar da clara associação entre tabagismo e obstrução ao fluxo aéreo, existe uma significativa variação dos efeitos do tabagismo sobre cada indivíduo (72).

Estudos epidemiológicos evidenciam que fatores genéticos podem alterar o impacto do tabagismo sobre o pulmão, determinado a taxa de deterioração da função pulmonar e a gravidade da doença. Entre os fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento da DPOC, a deficiência de AAT é o principal exemplo, por estar associada a um maior risco de desenvolver enfisema precoce, principalmente em tabagistas. Estudos em pacientes com DPOC mostrou a presença da deficiência grave de AAT em 1-2% nessa população (38).

De acordo com o estudo PLATINO, estima-se em 5 a 7 milhões de pacientes com DPOC no Brasil. Porém, a prevalência da deficiência de AAT na nossa população é desconhecida, assim como o fenótipo mais comum.

Embora o diagnóstico seja relativamente simples, estudos populacionais indicam que a deficiência de alfa-1 antitripsina é subdiagnosticada. Além disso, estudos populacionais indicam que o atraso no diagnóstico é estimado em 5,6 anos, após a procura pelo primeiro profissional (30). As recentes recomendações da Organização Mundial de Saúde preconizam programas de rastreamento através de testes quantitativos, especialmente em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica e asma (36).

Os principais obstáculos enfrentados em relação ao diagnóstico da deficiência da AAT estão, principalmente, relacionados ao escasso conhecimento dos médicos em relação a essa condição, e em segundo lugar, a pouca acessibilidade dos testes diagnósticos para a população (29). Apesar da crescente evolução de testes para o diagnóstico da deficiência de AAT, esses avanços ainda não foram empregados na rotina laboratorial e clínica (18). Com essas informações se observa a necessidade de métodos mais acessíveis para o diagnóstico da deficiência de AAT, tendo como

objetivo a inserção desses testes para a comunidade, principalmente no que diz respeito à população de risco.

O uso do papel de filtro representa uma técnica com baixo custo e conveniente para coletar, armazenar, transportar, manipular e conservar por longos períodos o sangue para dosagem de AAT (62). Ela é ideal para utilização em estudos populacionais e em programas de triagem sorológico, sendo essa experiência demonstrada nos programas de triagem neonatal durante os últimos 40 anos para doenças metabólicas hereditárias e infecciosas. Graças ao uso desse tipo de amostra, programas de triagem neonatal, inclusive em países pouco desenvolvidos, conseguiram realizar diagnóstico precoce de doenças congênitas e hereditárias, permitindo, assim, tratamentos específicos e acompanhamento adequado aos pacientes (73).

Ao considerar a extensão demográfica do Brasil e a população de 196 milhões de habitantes, é de suma importância a implantação de um método diagnóstico que contemple acessibilidade e facilidade no transporte.

Estudos epidemiológicos mundiais evidenciam que a deficiência de AAT é um dos distúrbios genéticos mais comuns. Assim, deveria ser dada maior importância ao seu diagnóstico precoce, visando ao impacto positivo que ele ocasionaria em termos de saúde pública. A partir do seu diagnóstico é possível a adoção de medidas simples e de custo extremamente baixo, como a educação aos pais para que orientem os seus filhos com deficiência de AAT a não fumar. Essa simples medida traria um grande impacto na prevenção da DPOC nesses jovens com deficiência. Um segundo aspecto extremamente relevante no diagnóstico da deficiência de AAT é a possibilidade do aconselhamento genético e o planejamento familiar, enfatizando a orientação e a prevenção, com afastamento de fatores de riscos e acompanhamento médico especializado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo primário

Desenvolvimento e validação do método de dosagem de alfa-1 antitripsina por imunonefelometria em amostras de papel filtro em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica no Brasil.

3.2 Objetivos secundários

Avaliar a reprodutibilidade dos métodos de imunonefelometria para avaliação da AAT em soro e papel filtro;

Elaboração de um ponto de corte para a triagem de pacientes com deficiência de AAT no papel filtro em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica no Brasil;

Avaliar a estabilidade do eluato do papel filtro 12 e 36 horas após a sua formação;

4. MÉTODOS

4.1 *Delineamento do estudo*

Este foi um estudo transversal, envolvendo pacientes com DPOC (definidos segundo critérios da *European Respiratory Society- ERS*) (74), que foram submetidos à coleta de sangue venoso para a dosagem da alfa-1 antitripsina sérica, de duas formas: (1) sangue total colhido da veia cubital em um tubo de EDTA para análise do plasma; (2) análise do gotejamento do sangue periférico sobre um papel filtro específico, coletado por uma picadura na região distal de um dos dedos da mão.

O estudo foi realizado no Centro de Reabilitação Pulmonar da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)/ Associação de Assistência à Criança Deficiente (AACD), durante o período de julho/setembro de 2011.

Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo1). A dosagem da AAT foi realizada pelo Centro de Diagnóstico Brasil, localizado no do Instituto do Sono – SP.

4.2 *Amostra estudada*

Os pacientes avaliados foram escolhidos dentre os pacientes que realizavam consulta médica no Ambulatório de DPOC do Centro de Reabilitação Pulmonar da Unifesp/AACD, conforme os critérios descritos abaixo:

Critérios de inclusão:

- Pacientes de ambos os gêneros;
- Idade igual ou superior a 40 anos;
- Portadores da DPOC (baseado nos critérios da ERS; relação VEF1/CVF em % do previsto pós-broncodilatador menor do que 88% para homens e menor do que 89% para mulheres (74));

- Doença pulmonar estável (não exacerbados) de acordo com os critérios descritos por CAZZOLA e colaboradores (75).

Critérios de exclusão:

- Qualquer quadro inflamatório/infeccioso não pulmonar que elevasse a concentração sérica de alfa1- antitripsina;
- Pacientes com diagnóstico prévio de deficiência de alfa-1 antitripsina;
- Pacientes com associação do diagnóstico clínico de asma;
- Parentes (filhos, irmãos, sobrinhos, primos) que foram convocados e diagnosticados a partir do caso índice.

4.3 *Espirometria*

Caso o paciente não tivesse uma espirometria recente (< 1 ano), foi realizada uma nova espirometria. Esse exame seguiu as normas da ATS e foi realizado pré e pós-administração de broncodilatador (BD), com um intervalo de 15 minutos entre um procedimento e outro (74).

Caso os pacientes tivessem feito uso de broncodilatadores ou fumado algum cigarro na hora anterior ao exame, a espirometria deveria ser remarcada para outro dia. Os valores de referência para o cálculo do percentual do previsto foram baseados nas equações NHANES (76).

Os indivíduos realizaram o teste sentados em uma cadeira, com os pés juntos e braços ao lado do corpo. Para a realização das manobras foi utilizado um espirômetro portátil, da marca Easy One[®]. Os espirômetros eram checados diariamente com uma seringa de 3 litros. Todas as manobras foram realizadas com o uso de um clipe nasal apropriado. Três manobras reproduzíveis (de até oito tentativas) foram aceitas. Após cada teste o espirômetro fornecia uma avaliação de qualidade das manobras realizadas. Foram feitas as espirometrias com nota “A ou B” para as manobras, ou seja, os dois maiores valores da capacidade vital forçada e do volume expiratório forçado no primeiro segundo diferiram em menos de 150 ml.

4.4 Coleta das amostras de sangue

Os pacientes foram submetidos à coleta de sangue na sala de enfermagem do Centro de Reabilitação Pulmonar da UNIFESP. Todos os procedimentos relacionados à coleta de sangue foram realizados por uma técnica de enfermagem previamente treinada.

Os materiais utilizados permaneceram lacrados e estéreis até o momento da coleta. A sala de enfermagem foi previamente higienizada antes de cada coleta. Foi realizada uma punção venosa periférica em um dos membros superiores, obtendo 5 ml de sangue venoso e transferido para um tubo de EDTA, o qual foi mantido em ar ambiente durante 30 minutos e, posteriormente, centrifugado durante 10 minutos com a rotação de 3.200 rpm. Após esse procedimento o plasma foi transferido para um tubo de plástico de 2,0 ml, da marca Eppendorf®, através de uma pipeta estéril e, subsequentemente, congelado a -20°C.

Para coleta do sangue em papel filtro, Whatman 903™, foi realizada uma picadura na região distal de um dos dedos da mão, através de uma lanceta estéril, com gotejamento do sangue sobre o cartão de papel filtro específico, completando totalmente os cinco círculos do cartão. Era observado criteriosamente se o sangue havia ultrapassado o verso do cartão (fig. 4). Após o procedimento o papel filtro foi seco em ar ambiente durante 12 horas, como recomendado por diferentes protocolos. O material foi guardado dentro de um envelope de conservação da amostra. O papel filtro foi congelado à temperatura de -20°C, até o momento da sua análise (figura 4).



Figura 4: Amostras de sangue em papel filtro

4.5 *Análise das amostras de sangue*

As amostras de sangue foram analisadas no equipamento Siemens BNII no Centro de Diagnóstico Brasil, localizado no Instituto do Sono – SP, em julho de 2012. Os ensaios foram realizados por um bioquímico responsável, com o acompanhamento da assistência técnica da SIEMENS.

4.5.1 Preparação das amostras para análise

O plasma foi descongelado, transferido para tubos de acrílico de 5 ml através de uma pipeta estéril e centrifugado durante 30 minutos com a rotação de 3.200 rpm.

O papel filtro foi descongelado e preparado sobre uma bancada previamente higienizada. Os cartões foram perfurados em um diâmetro de 6 mm com uma caneta específica da marca Harris uni-core 6.00[®]. Os círculos de papel filtro obtidos foram colocados em tubos da marca Eppendorf[®], aos quais foram adicionados 200 µL de soro fisiológico. O tubo contendo essa solução permaneceu por 12 horas a 4°C durante a noite que antecedeu a sua análise, como descrito em protocolos anteriores. No dia posterior, o papel foi retirado da solução do tubo com uma pinça estéril e, subsequentemente, a solução foi centrifugada durante 30 minutos à rotação de 3200 rpm, formando, assim, o eluato da amostra (figura 5). Destas amostras foram separados 20 eluatos para serem analisados após 36 horas a sua preparação, que foram mantidas a 4°C.

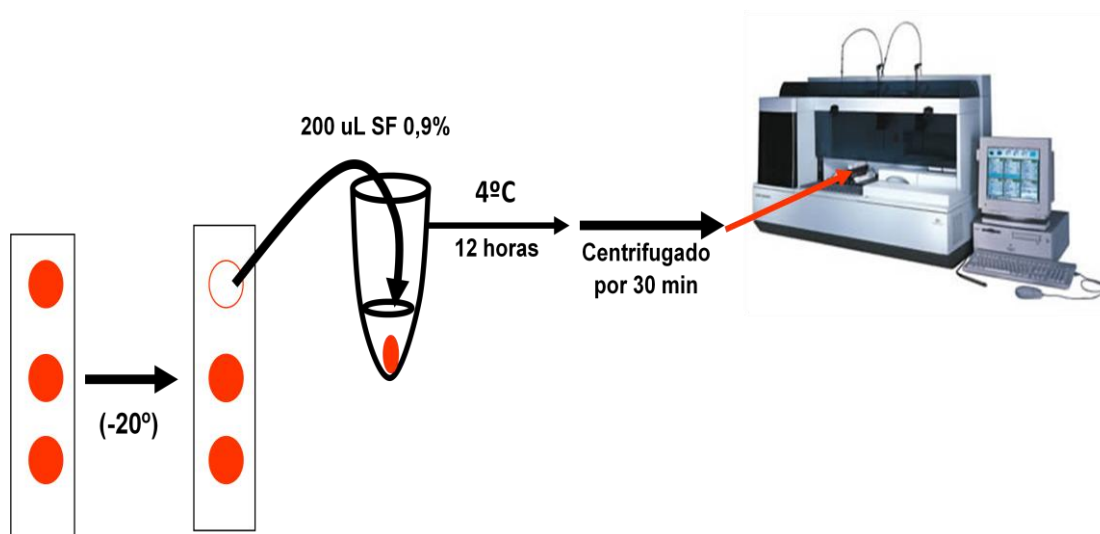


Figura 5: Imagem ilustrativa com o passo a passo dos procedimentos realizados para análise do sangue em papel filtro, desde a coleta do sangue até a sua análise no equipamento da SIEMENS BNII.

4.5.2 Calibração do equipamento

Inicialmente o equipamento foi calibrado, obtendo-se as curvas de calibração, de acordo com o lote dos reagentes utilizados para análise das amostras.

As curvas de calibração foram realizadas com o padrão da SIEMENS SL de proteína N (Nefelometria) para a determinação da alfa-1 antitripsina para o equipamento BNII. Esse padrão de proteína é um soro humano estabilizado líquido e conservado com azida de sódio < 0,1%. O reagente é fornecido pronto para o seu uso. O mesmo foi mantido refrigerado entre 2 a 8°C até a sua abertura e, posteriormente, mantido hermeticamente fechado e refrigerado na mesma temperatura por até 14 dias.

As curvas de calibração foram testadas com diferentes diluições: 1:160; 1:80; 1:40; 1:20; 1:10; 1:5. A margem de desvio da proteína padrão (*“standard”*) e o valor obtido foram aceitos entre uma variação de + 5 a - 5. As curvas realizadas durante a análise das amostras estão em anexo (Anexo 2).

4.5.3 Controles diários

Foram realizados controles diários com o padrão da SIEMENS SL em diferentes concentrações de AAT (figura 6). As concentrações foram classificadas, de acordo com o fabricante, em:

- Baixo (Low) – 101,0 mg/dl;
- Médio (Medium) – 159,0 mg/dl;
- Alto (High) – 231,0 mg/dl.

Cada concentração de AAT foi armazenada em um frasco, como mostrado na figura 6. Os controles foram realizados para garantir rigor e precisão da análise da proteína de AAT. Todos os controles da proteína são soros humanos líquidos estabilizados e conservados com azida de sódio < 0,1%. Os controles fornecidos estão prontos para o seu uso. Os mesmos foram mantidos refrigerado entre 2 a 8°C até a sua abertura e, posteriormente, mantidos hermeticamente fechados e refrigerados na mesma temperatura por até 14 dias.

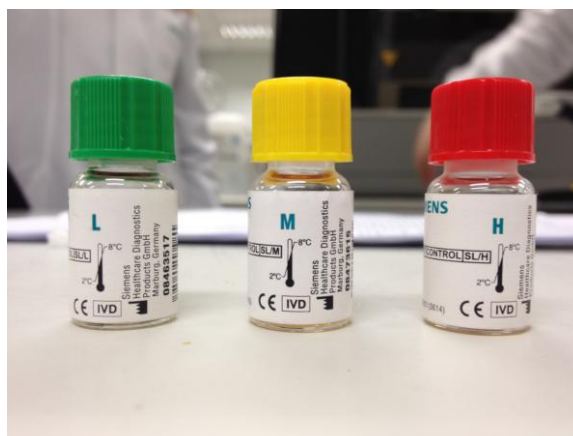


Figura 6: Controles diários SL SIEMENS L= baixo, M= médio e H= alto.

Antes do uso dos controles, os mesmos foram estabilizados à temperatura de 15 a 25°C antes do ensaio. Os controles baixo, médio e alto foram processados e avaliados da mesma maneira que as amostras dos pacientes. Os controles foram colocados nas racks das amostras e o reagente de antissoro para AAT nas racks para reagentes (figura 8). Segundo orientação prévia da SIEMENS, foi considerado um intervalo de confiança de +15% a -15%, entre os valores reais dos controles e os

obtidos pelo equipamento. Os controles realizados diariamente estão anexados (Anexo 3).

4.5.4 Técnica da análise da concentração de AAT

Inicialmente realizou-se a higienização das tubulações com uma solução de H₂O com aditivo de 100 ml específico para o equipamento BN II. Entre os ensaios das amostras o equipamento realiza uma higienização automática com a solução descrita acima.

O reagente utilizado para o ensaio é o antissoro N para AAT, da SIEMENS para o equipamento BN II (fig. 7). Esse é um reagente para diagnóstico *in-vitro*, usado para a determinação quantitativa da AAT sérica através de imunonefelometria. O antissoro N é um soro animal líquido produzido por imunização de coelhos com a α 1-antitripsina humana altamente purificada. A concentração de anticorpos ativos é $< 2,4$ g/ sendo conservado com azida de sódio $< 0,1\%$. Esse reagente se encontra pronto para o seu uso e não requer qualquer preparação adicional. Os mesmos são mantidos refrigerados entre 2 a 8°C até a sua abertura e, posteriormente, mantidos hermeticamente fechados e refrigerados na mesma temperatura por até três dias, sendo evitada qualquer tipo de contaminação.

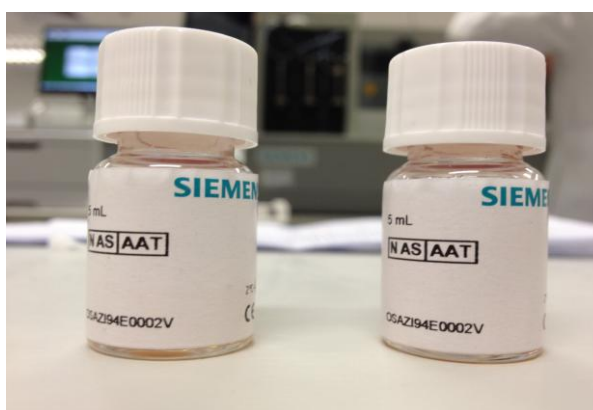


Figura 7: Reagentes antissoro N para AAT da SIEMENS

As amostras são colocadas em tubos de acrílico de 5 ml, como descrito acima. Controles diários foram realizados tanto para o protocolo para plasma 1:20, quanto para o papel filtro, onde não existe diluição, sendo 1:1.

As amostras diluídas de plasma devem ser medidas até quatro horas após a sua preparação, enquanto que as amostras de papel filtro têm um intervalo de 12 a 20 horas (incluindo a diluição de 12 horas durante a noite da amostra) para serem analisadas.

As amostras de plasma em tubos de acrílico de 5 ml são colocadas dentro das racks e estas colocadas no equipamento BNII (figura 8). O processo de dosagem da AAT plasmática é realizado em duas fases. Na primeira fase, 20 μ L da amostra são coletados por uma probe (seringa que realiza o transporte das amostras) e, posteriormente, injetados sobre placas brancas chamadas de poços de pré-diluição (fig. 8). Nessa fase, 80 μ L de solução tampão (composição: solução de glicol de polietileno e cloreto de sódio 11.6 g/l em tampão fosfato 0,05 mol/l) são adicionados aos 20 μ L da amostra, com a probe funcionando como um misturador para homogeneizar as soluções. Após a primeira fase a probe transfere a solução para as cuvetas, onde ocorre a segunda etapa do ensaio. Nas cuvetas são adicionados mais 80 μ L de solução tampão e outros 40 μ L do reagente da amostra. Dentro das cuvetas as amostras são mantidas à temperatura de 37°C, simulando a temperatura corpórea, onde ocorre a reação do complexo entre o antígeno e o anticorpo (fig. 8). As proteínas contidas no plasma humano formam, então, complexos imunitários em uma reação imunoquímica com anticorpos específicos, realizando uma ligação antígeno-anticorpo. Após essa ligação uma fonte de luz intensa é transmitida. A presença dos complexos imunitários refletem a luz que, por sua vez, é captada por um fotômetro localizado no equipamento. A intensidade da luz dispersada é proporcional à concentração da proteína presente na amostra. O resultado é então comparado com um padrão de concentração conhecido, que foi previamente obtido pela calibração com o padrão SL de proteína N. Todas as partes do equipamento descritas acima estão ilustradas na figura 8.

As amostras de papel filtro passaram pelas mesmas etapas, porém não foi realizada a primeira fase, a qual corresponde à diluição. Nesse ensaio não houve a realização da diluição, uma vez que as amostras já foram pré-diluídas e a quantidade de amostra presente foi relativamente menor. O processo ocorreu diretamente nas cuvetas, onde foram adicionados 20 μ L da amostra, juntamente com 40 μ L do reagente antissoro N para AAT. As reações aconteceram sob a

mesma temperatura, 37°C, baseadas no mesmo princípio da imunonefelometria como descrito acima. Após o ensaio, os tubos de acrílico contendo as amostras de plasma e o eluato foram desprezados em caixas para material perfuro cortante DESCARPAC.

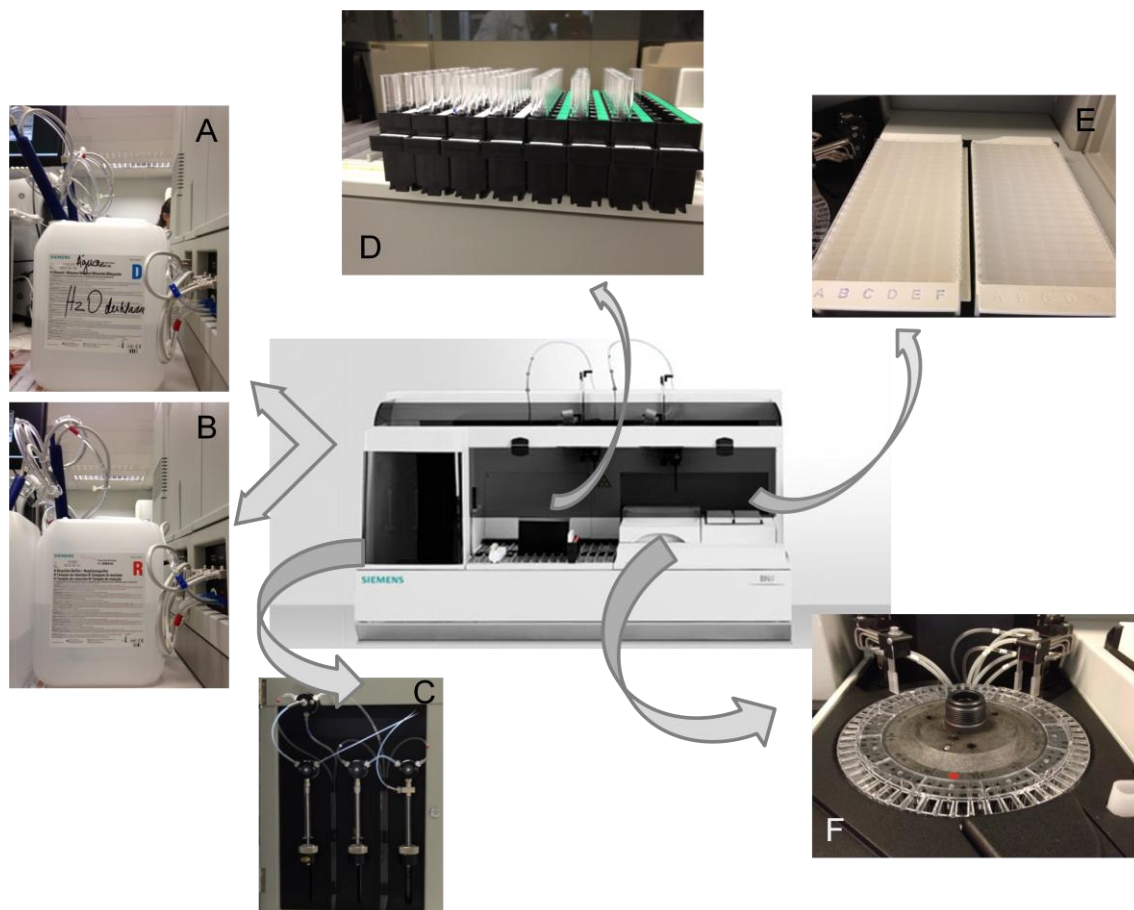


Figura 8: No centro da figura está a foto do equipamento BNII da SIEMENS e as imagens ao redor correspondem às áreas ampliadas do equipamento que possuem importantes funções para a dosagem da AAT. A figura A representa a solução de H₂O que foi misturada a um aditivo específico do BN II da SIEMENS, o qual tem a função de limpar os circuitos do equipamento ao ligar e entre as dosagens. A figura B ilustra a solução tampão (solução de glicol de polietileno e cloreto de sódio (11,6 g/l) em tampão fosfato (0,05 mol/l), que foi adicionada à amostra para a sua diluição. A figura C demonstra as seringas do equipamento que são responsáveis pela impulsão do líquido nas probes; a primeira é responsável pelos reagentes, a segunda pela limpeza dos circuitos com a solução de H₂O mais aditivo e a terceira pela circulação das amostras pela probe. A figura D ilustra as racks com os tubos de acrílico para posterior análise. A figura E são os stripers de diluição onde foi realizada a diluição da amostra de plasma com a solução tampão. A figura F representa as cuvetas, onde foi propriamente realizado o ensaio imunonefelométrico da amostra com o reagente.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no programa SPSS Statistics 18.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois). As variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio-padrão e as variáveis categóricas com porcentagens.

A correlação de Pearson foi aplicada para determinar a associação entre duas variáveis paramétricas descritas abaixo:

- Valores séricos de AAT obtidos em duplicata;
- As medidas em duplicata do eluato;
- Medidas de duplicata do eluato em diferentes momentos após sua formação;
- E, por fim, entre as medidas de AAT sérica em relação ao eluato.

Foi construída a curva de característica de operação do receptor (ROC) para a análise da sensibilidade e especificidade dos valores de AAT no eluato em papel filtro em relação ao valor sérico. A curva ROC foi considerada adequada quando a área sobre a curva, que representa a acurácia do método, foi maior que 0,8.

Os pontos de corte no papel filtro foram também caracterizados pelo valor preditivo positivo (VPP), que representa a probabilidade de um caso identificado com um determinado instrumento ser de fato positivo, e pelo valor preditivo negativo (VPN), que demonstra a probabilidade de uma pessoa com o resultado negativo realmente não apresentar a doença. Esses valores foram calculados da seguinte forma:

$$VPP = \frac{Se \times P}{(Se \times P) + (1 - Es) \times (1 - P)}$$

$$VPN = \frac{Es \times (1 - P)}{Es \times (1 - P) + (1 - Se) \times P}$$

Se - sensibilidade; **Es** – especificidade **VPP** - valor preditivo positivo; **VPN** - valor preditivo negativo; **P** - prevalência.

Para a determinação do ponto de corte e do intervalo de confiança (IC – 97%) para o papel filtro foi utilizado o método de reamostragem “*bootstrap*”. Esse método consiste na técnica de reamostragem, onde os dados da amostra real (a amostra estudo) são sorteados (com N-1 observações), sendo gerados intervalos de confiança para cada valor recalculado. A amostra é sorteada 1000 vezes e são realizadas 1000 modelos para cada uma dessas amostras N-1, aumentando o seu poder em casos de amostras pequenas e melhorando os estimadores de confiança quando a distribuição da amostra não é conhecida ou quando a distribuição populacional não é conhecida.

A amostra do nosso estudo consiste em 192 pacientes, entretanto, o número de pacientes com deficiência de AAT é restrito a apenas três. A reamostragem permite que o intervalo de confiança e o ponto de corte da amostra sejam mais confiáveis e precisos. Esse intervalo, no caso deste estudo, foi utilizado para indicar a confiabilidade de uma estimativa, definindo os limites inferior e superior de um conjunto de valores que tem certa probabilidade de conter no seu interior, o valor verdadeiro do efeito da intervenção em estudo.

6. RESULTADOS

6.1 *Amostra*

Foram contatados 240 pacientes ao longo dos três meses do estudo. No entanto, somente 192 pacientes preenchiam os critérios de elegibilidade. Dos 48 indivíduos que não preencheram os critérios de inclusão 17 estavam exacerbados, 18 não preencheram os critérios espirométricos, cinco tinham resposta ao broncodilatador e história compatível com asma, três tinham bronquiectasia, dois sarcoidose pulmonar, dois pacientes apresentaram história de câncer pulmonar e um com sequela de tuberculose pulmonar.

6.2 *Dados demográficos*

Os dados demográficos dos indivíduos participantes do estudo estão representados na tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os sexos. A média de idade da população estudada foi de 68,5 anos ($\pm 9,6$). Os indivíduos eram predominantemente, da raça branca.

As medidas de espirometria também estão descritas na tabela 1, e como esperado para indivíduos portadores de DPOC, eles apresentaram baixos valores da relação VEF_1/CVF e VEF_1 , caracterizando o distúrbio ventilatório obstrutivo.

Tabela 1: Características demográficas da amostra

Características	Pacientes (n = 192)
Gênero – N (%)	
Feminino	105 (54,7)
Masculino	87 (45,3)
Idade	
Idade (anos)	65,8 ± 9,6
Etnia – N (%)	
Branca	157 (81,8)
Não branca	35 (18,2)
Espirometria	
VEF ₁ / CVF (absoluto)	0,47 ± 0,10
VEF ₁ / CVF	62,4 ± 14,4
CVF (L)	2,64 ± 0,77
CVF (% do previsto)	82,4 ± 19,9
VEF ₁ (L)	1,27 ± 0,72
VEF ₁ (% do previsto)	51,4 ± 18,9

As variáveis numéricas são descritas em média e desvio padrão.

VEF₁ – Volume expiratório final no 1º segundo

CVF – Capacidade vital forçada

6.3 Reprodutibilidade da alfa-1 antitripsina sérica e em papel filtro

A alfa-1 antitripsina foi quantificada no soro e no eluato de papel filtro em duplicata para avaliação da reprodutibilidade da mesma amostra. A figura 9 mostra a correlação entre as duas medidas da AAT sérica, ($r=0,99$) e a figura 10 o eluato do papel filtro ($r=0,52$).

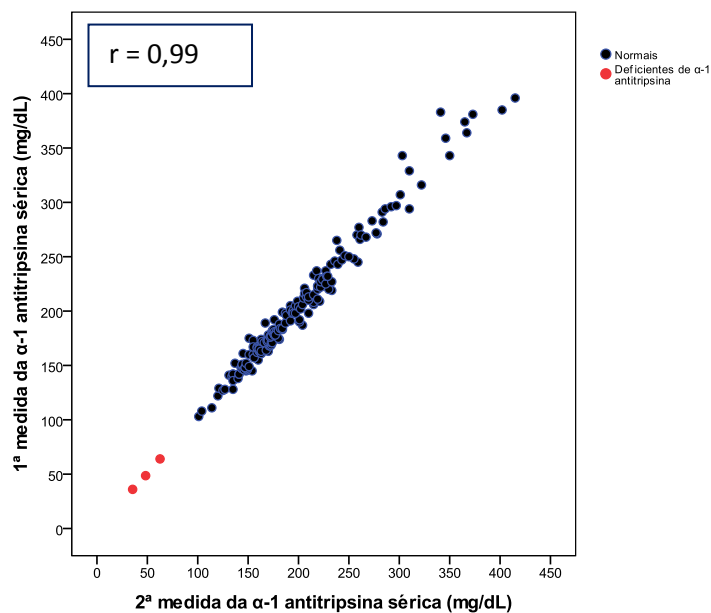


Figura 9: Correlação entre as duas medidas de AAT sérica (n=192)

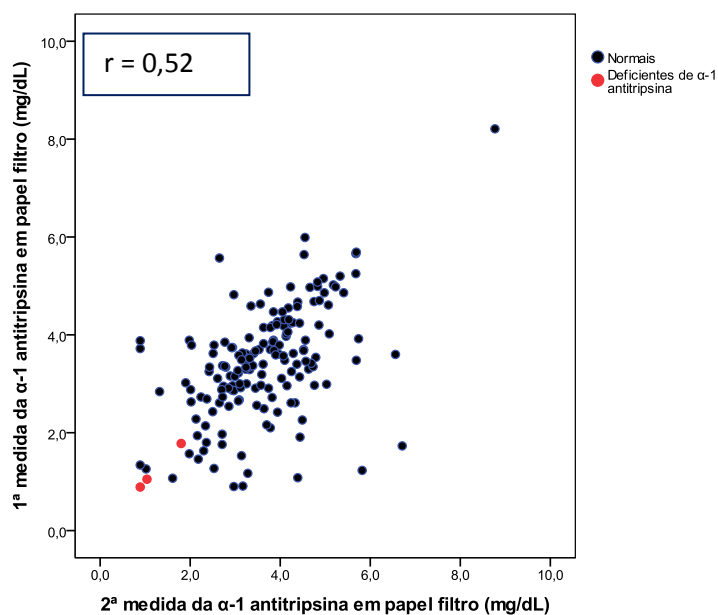


Figura 10: Correlação entre as duas medidas de AAT no eluato de papel filtro (n=192)

Alguns eluatos apresentaram turbidez em uma das duas medidas realizadas, o que poderá interferir no valor da AAT e, consequentemente, ocasionar disparidade entre as duas medidas da mesma amostra. Por esse motivo optou-se em realizar uma segunda correlação entre amostras que não apresentaram turbidez nas duas medidas do eluato (n = 116). A segunda análise apresentou correlação de $r = 0,84$ e está ilustrada pela figura 11. Entretanto, nenhum paciente com deficiência de AAT

foi incluído nessa análise, pois apresentavam turbidez em uma das amostras da duplicata.

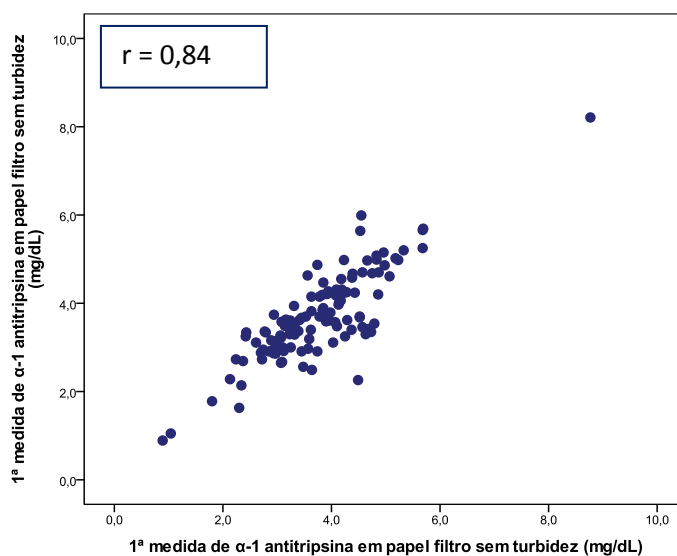


Figura 11: Correlação entre as duas medidas de AAT no eluato em papel filtro em amostras sem turbidez (n=116)

Para a análise da correlação entre a AAT sérica e o eluato em papel filtro foi selecionado um dos valores do soro e eluato que não possuíam turbidez, sendo a correlação encontrada de $r = 0,45$ (figura 12).

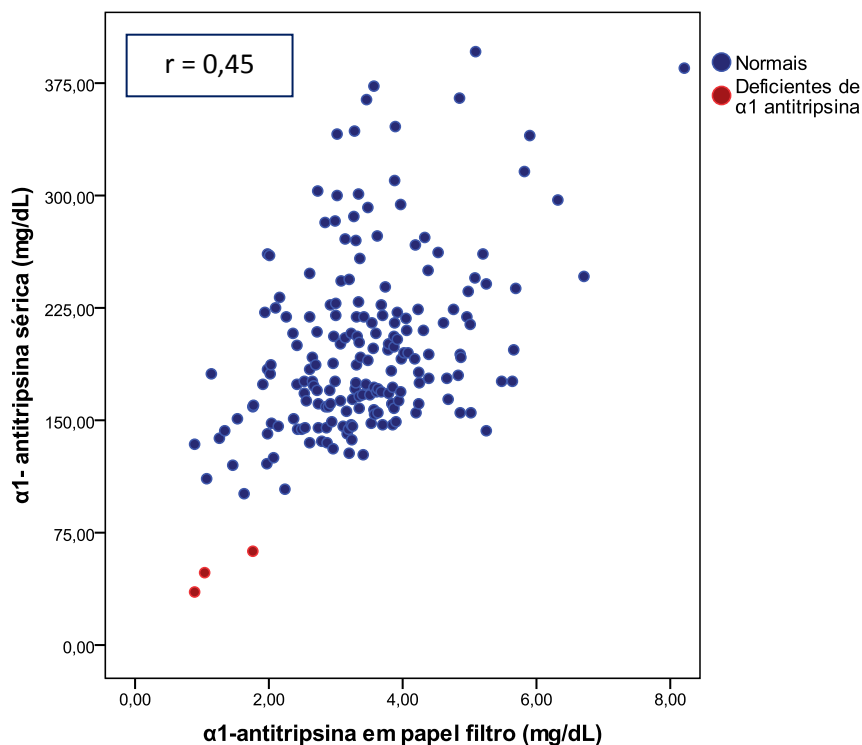


Figura 12: Correlação entre a AAT sérica e o eluato em papel filtro (n= 192)

Algumas amostras do eluato em papel filtro foram analisadas entre os períodos de 12 e 36 horas após a sua preparação (tabela 2).

Tabela 2: Dosagens do eluato do papel filtro 12 e 36 horas após sua preparação (mg/dL)

Pacientes	12 horas	36 horas
1	3,09	4,80
2	2,14	2,37
3	2,55	2,70
4	1,51	1,82
5	2,54	3,80
6	3,94	5,38
7	3,07	3,45
8	4,02	3,02
9	5,23	3,34
10	3,19	1,83
11	3,31	3,82
12	3,41	3,15
13	2,32	1,91
14	2,72	2,51
15	3,14	3,66
16	6,15	4,60
17	4,00	3,89
18	2,74	2,63
19	4,50	4,83
20	3,51	3,37

A correlação entre as amostras analisadas com 12 horas e 36 horas está demonstrada na figura 13, ($r = 0,60$), considerada como correlação baixa.

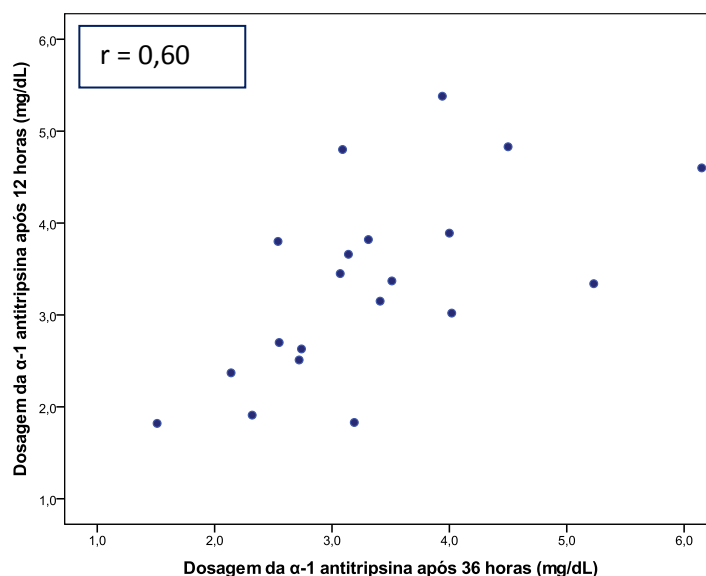


Figura 13: Correlação entre a dosagem da alfa-1 antitripsina pelo eluato em papel filtro 12 e 36 horas após a sua preparação (n= 20)

6.4 Sensibilidade e especificidade do eluato

Como a dosagem do eluato é um teste para triagem de pacientes, torna-se fundamental a avaliação da sensibilidade e especificidade do método.

Através do teste de coeficiente de “bootstrap”, comparando os valores de medição do soro (padrão ouro) com os valores encontrados no eluato do papel filtro, foi encontrado o ponto de corte para o eluato de 2,02 mg/dL (1,45 – 2,64), com um intervalo de confiança de 97%. Ao levar em consideração o impacto que causaria um diagnóstico falso negativo, recomenda-se a utilização do valor máximo do intervalo de confiança, 2,64 mg/dL, para assegurar que 100% dos pacientes com deficiência sejam incluídos na triagem. Os valores da sensibilidade, especificidade, VPP e VPN dos valores de eluato do papel filtro estão demonstrados na tabela 3. Ambos os valores possuem sensibilidade de 100%, entretanto, a especificidade e o VPP são maiores no ponto de corte de 2,02 mg/dL, pois esses valores exigem que menos pacientes tenham que ser reconvocados para a repetição do exame. Os resultados mostram que, quando utilizado o ponto de corte de 2,02 mg/dL, obtivemos 14 resultados positivos para a detecção de três indivíduos com deficiência de AAT. Entretanto, com o valor de 2,64 mg/dL, 32 pacientes precisariam realizar o exame no soro para o diagnóstico dos mesmos três pacientes. Vale ressaltar que

todos os pacientes com deficiência de AAT da amostra tinham dosagem inferior a 1,80 mg/dL (62,6 mg/dL no soro), sendo assim os dois valores (2,02 mg/dL e 2,64 mg/dL) apresentam sensibilidade e o VPN de 100%. Porém, como foi mostrado o eluato é instável, portanto outras amostras podem não apresentar o mesmo resultado. Em vista disso, recomendamos o uso do valor máximo do intervalo de confiança (2,64 mg/dL), pois assim é possível ter 100% de confiança que nenhum paciente com deficiência será classificado como normal.

Tabela 3: Pontos de corte pelo coeficiente de “bootstrap”

	Ponto de corte	Intervalo de Confiança – 97%	
		Mínimo	Máximo
	2,02	1,45	2,64
Sensibilidade	100%	66,6%	100%
Especificidade	95,7%	98,9%	86,7%
Valor Preditivo Positivo	27,2%	50%	10,7%
Valor Preditivo Negativo	100%	99,4%	100%

Estatística: Regressão Linear “bootstrap”.

A figura 14 representa a curva de características de operação do receptor (ROC) de sensibilidade e especificidade do eluato em papel filtro em relação à medida do soro (padrão ouro). A área abaixo da curva encontrada foi de 0,98, mostrando uma excelente sensibilidade e especificidade em relação ao método padrão.

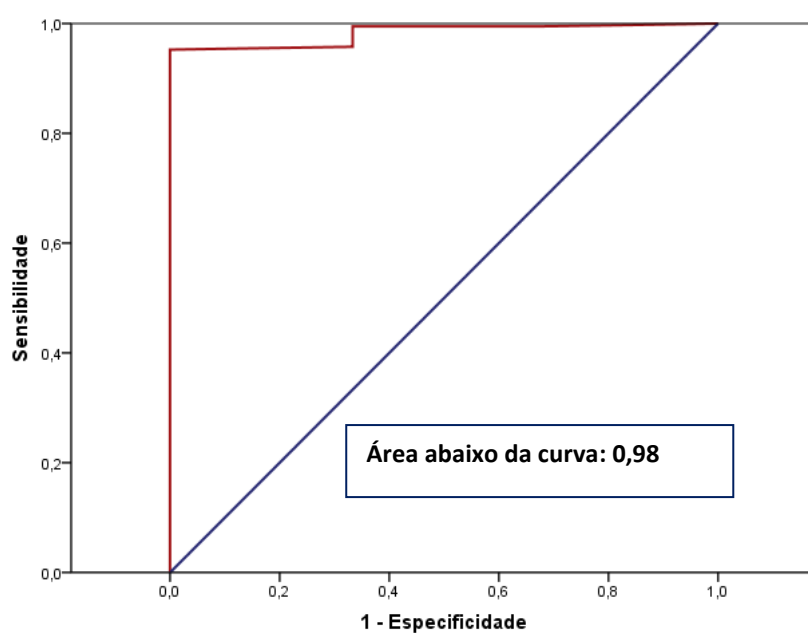


Figura 14: Curva de característica de operação do receptor (ROC) do eluato de papel filtro para dosagem de AAT.

7. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi validar a técnica de dosagem da proteína alfa-1 antitripsina em eluato de papel filtro, pelo método de imunonefelometria. Optamos em criar um intervalo de confiança a partir do ponto de corte definido pela técnica de reamostragem “*bootstrap*”, avaliando a sensibilidade e a especificidade dos valores e a sua interferência na escolha clínica para a triagem de novos pacientes. A decisão de se criar um IC para o ponto de corte do papel filtro foi decorrente da alta variabilidade da técnica, como será discutido.

Observou-se nos resultados que a escolha de um ponto de corte mais baixo aumenta a especificidade, permitindo triar um número menor de pacientes. Entretanto, o seu valor preditivo negativo também aumenta, fazendo que se possa classificar erroneamente um paciente como normal, quando na verdade esse apresenta deficiência. Por outro lado, ao utilizar o valor máximo do IC implica que mais pacientes sejam reavaliados, porém é possível ter 100% de confiança que nenhum paciente com deficiência de AAT será classificado como normal.

A análise pelo papel filtro vem se mostrando uma ótima ferramenta como o primeiro passo para o diagnóstico da deficiência de AAT, seguido de testes mais específicos para determinação da alteração genética. Além do mais, apresenta a vantagem de serem realizados em uma população menor. Como explanado na introdução, existem diversos métodos diagnósticos para a deficiência de AAT: imunonefelometria no soro; focalização isoelétrica; genotipagem; e o sequenciamento genético. Esses métodos, em geral, são de alto custo, além de depender de armazenamento e transporte adequados (61). A dosagem da AAT sérica é uma técnica amplamente utilizada para diagnóstico, entretanto exige um profissional especializado para a coleta de sangue venoso e seu custo é mais elevado (61, 63, 66). Ao considerar a extensão territorial do Brasil e o número reduzido de laboratórios aptos a dosar a concentração da alfa-1 antitripsina no soro, a técnica do papel filtro é a mais adequada para a realidade nacional. A técnica em papel filtro possui três características fundamentais para testes de triagem, acessibilidade à população, facilidade no seu manuseio e baixo custo. (61, 77)

As amostras em soro e no eluato de papel filtro, embora sejam amostras diferentes, são analisadas pelo mesmo método, imunonefelometria, porém com

valores de referência e diluições diferentes. A imunonefelometria é baseada na emissão de um feixe de luz intenso sobre uma amostra que contém complexos imunes entre a proteína de AAT e anticorpos anti-AAT. O feixe de luz ao entrar em contato com esse complexo imune é refletido e captado por um fotômetro, sendo a intensidade da radiação refletida proporcional à quantidade de antígeno presente na amostra. Deve-se ter cuidado ao utilizá-la isoladamente, pois esse método pode superestimar em até 35-40% o valor de AAT sérica, em vista da interferência de valores altos de lipídios e hemoglobina (78). Nas amostras do eluato em papel filtro, alguns estudos mostram que não há interferência da hemoglobina nessas dosagens, entretanto há a necessidade de maiores estudos tanto sobre a interferência da hemoglobina quanto de lipídios (67, 79).

O teste quantitativo da AAT sérica é recomendado pelas Sociedades Americana e Europeia de Tórax para o diagnóstico da deficiência de AAT. Neste estudo, os resultados de AAT das amostras séricas em duplicata foram altamente reprodutíveis ($r=0,99$), mostrando a excelente estabilidade das amostras. Entretanto, como o teste não é realizado na grande maioria das cidades brasileiras, o manuseio, armazenamento, transporte e custos inviabilizam a sua utilização em larga escala. Em vista disso, a imunonefelometria em papel filtro se torna uma atraente opção para a acessibilidade do teste para a triagem em larga escala (77).

No presente estudo foi determinado o ponto de corte de 100 mg/dL para o diagnóstico da deficiência da AAT no soro. Esse ponto de corte foi avaliado por Simsek e colaboradores e apresentou sensibilidade de 88%, especificidade de 87% e valor preditivo negativo de 99%, ao ser comparado com a fenotipagem (80). Diante disso, optou-se para este estudo a utilização de um ponto de corte superior ao recomendado pelo documento da ATS/ERS, que é de 50 mg/dL ou 1,1 μ L (18), pois estudos mais recentes mostraram que a utilização do ponto de corte recomendado pode deixar de diagnosticar quase todos os pacientes com fenótipo PI * SZ, SS, MS e MZ, pois a sua sensibilidade e especificidade são de 66% e 67%, respectivamente (81). Ferraroti e colaboradores estipularam o ponto de corte de 113 mg/dL e Corda e colaboradores proporam o ponto de corte de 120 mg/dL, ou seja, indicativos acima do recomendado pelo documento da ATS/ERS. Todavia, tiveram como finalidade incluir os pacientes com deficiência intermediária da AAT que pudessem estar com

aumento momentâneo da AAT em decorrência de algum processo inflamatório agudo. (61, 82).

Os dados deste estudo mostraram uma baixa correlação entre a AAT sérica e o papel filtro ($r = 0,45$), sugerindo que os valores do papel filtro não podem ser comparados quantitativamente aos encontrados no soro. Esse achado difere dos encontrados por alguns autores que observaram uma boa correlação entre o papel filtro e a dosagem sérica de AAT. Wencker e colaboradores realizaram a validação do método de imunonefelometria com a finalidade de rastrear novos pacientes com deficiência de AAT em pacientes com doença pulmonar, e compararam os valores do papel filtro contra o soro em uma amostra de 427 indivíduos. A correlação encontrada entre as amostras de papel filtro e a AAT sérica foi excelente ($r = 0,95$) e nenhum resultado falso negativo ou falso positivo foi encontrado. Posteriormente, eles realizaram o rastreamento em 1.060 indivíduos com o papel filtro e concluíram que a técnica é uma boa alternativa para o rastreamento da deficiência de AAT em grandes populações (83). Esses resultados corroboram com os achados de Costa e colaboradores que compararam os valores encontrados em 500 amostras séricas e em papel filtro, obtendo uma boa correlação ($r^2=0,86$) (67). Entretanto, os autores salientam que apesar das duas técnicas apresentarem boa correlação, o papel filtro não é um método quantitativo, mas semi-quantitativo, sendo apropriado para triagem, baseado em um ponto de corte, sendo os resultados apresentados como positivo ou negativo para a presença da enzima de AAT. Um grupo de pesquisadores Italianos também validou o papel filtro comparado com o método padrão no soro, porém avaliando 149 pacientes com concentração sérica baixa e muito baixa de AAT (0.16 – 0.53 g/L) e indivíduos com AAT em níveis intermediários e normais (0.54 – 2.93 g/L). Os coeficientes de correlação dos dois grupos foram $r^2 = 0,98$ e $r^2 = 0,90$, respectivamente (68). No entanto, os autores não avaliaram seus resultados com a curva ROC ou definiram os valores preditivos positivo ou negativo para a avaliação da sensibilidade e especificidade.

O fato de haver uma variação no método de imunonefelometria levou a estabelecer nesta pesquisa o cálculo de intervalo de confiança, obtendo-se os valores mínimo e máximo em relação ao valor de um ponto de corte. Para a elaboração desse intervalo foi utilizado a técnica de reamostragem de “*bootstrap*”, pois a população de indivíduos portadores da deficiência foi pequena. Esse método

possibilitou o aumento do poder amostral, pois refaz o cálculo 1000 vezes, deixando, assim, o intervalo de confiança mais preciso. Através dessa análise foi encontrado o ponto de corte de 2,02 mg/dL, com um intervalo de confiança de 97% de 1,45 a 2,64. A partir desses resultados foi analisado a sensibilidade, especificidade e valores preditivo positivo e negativo do ponto de corte estabelecido pelo “*bootstrap*” (tabela 3). Com o ponto de corte de 2,02 mg/dL do papel filtro observou-se uma sensibilidade de 100% e especificidade de 95,7%, com valor preditivo positivo de 27,2% e negativo de 100%. Os três pacientes com deficiência de AAT tinham valores da AAT no papel filtro abaixo de 2,02 mg/dL. Entretanto, como existe uma variabilidade no método, recomendamos que os indivíduos que apresentarem valores da AAT no papel filtro abaixo do valor máximo do IC (2,64 mg/dL), sejam investigados através de testes mais específicos, garantindo maior confiabilidade ao método. Deve-se resaltar que ao ser utilizado o valor máximo do intervalo de confiança, há 100% de confiança que nenhum paciente com deficiência de AAT será identificado como normal. Ao realizar uma detalhada revisão na literatura não foi encontrado nenhum estudo que apresentasse valores de intervalo de confiança para os valores de AAT no papel filtro.

Para Kwon e colaboradores, os testes de rastreamento devem ser altamente sensíveis, pois essa característica diminui a probabilidade de um indivíduo ter um resultado falso negativo. A maior preocupação em testes de rastreamento são os falsos negativos, pois, provavelmente, o indivíduo será identificado somente quando apresentar algum sintoma relacionado, às vezes já muito tardiamente, comprometendo o seu prognóstico. Por outro lado, visando à detecção de todos os casos com a deficiência, estabelecendo-se um ponto de corte mais elevado, ocorrerá maior número de casos falsos positivos. A desvantagem dos resultados falsos positivos na detecção de AAT é evidente, mais exames séricos serão realizados. Entretanto, é importante lembrar que o rastreamento para novos deficientes deve começar pela realização de testes de triagem, e não terminar com eles (84).

Bals e colaboradores, na Alemanha, utilizaram o método de imunonefelometria em papel filtro como triagem para uma população alvo, para descartar os indivíduos normais (sem deficiência de AAT), e afirmam que o método é altamente sensível e seu falso negativo muito baixo, como encontrado no presente

trabalho (69). Os autores comentam a dificuldade em estabelecer um ponto de corte apropriado, uma vez que a alfa-1 antitripsina é uma proteína instável, podendo se elevar em processos inflamatórios agudos e com isso classificar erroneamente pacientes com deficiência de AAT como normais.

Em relação ao ponto de corte no papel filtro para a triagem de pacientes com deficiência de AAT, foi encontrado na literatura dois estudos com valores distintos. O primeiro estudo foi publicado por Costa e colaboradores, no ano de 2000, avaliaram 300 pacientes com DPOC e 200 indivíduos saudáveis, e observaram que todos os pacientes com deficiência de AAT tinham valores abaixo de 1,8 mg/dL no papel filtro, que foi equivalente a 100 mg/dL na concentração sérica (67). Após esse estudo Wenker e colaboradores e Rodriguez e colaboradores adotaram o mesmo ponto de corte sugerido por Costa e colaboradores, não encontrando nenhum resultado falso positivo ou negativo quando comparado a testes genéticos, mostrando que o valor estabelecido no papel filtro foi altamente preciso (83). Em 2006, Gorrini e colaboradores avaliaram 114 pacientes e estabeleceram o ponto de corte de 1,13 g/L no papel filtro com sensibilidade de 0,92 e especificidade de 0,90 (68). Esses valores de sensibilidade e especificidade foram semelhantes aos demonstrados no presente estudo, entretanto o ponto de corte estipulado nesta pesquisa foi consideravelmente maior, pois decidimos adotar a sensibilidade de 100%, diminuindo muito a possibilidade de resultados falsos negativos.

A imunonefelometria em papel filtro desenvolvida neste trabalho apresentou uma correlação moderada ($r = 0,54$) entre os dois valores da mesma amostra. Entretanto, algumas das amostras apresentaram turbidez em um dos valores da duplicata, fator que reduz a reflexão da luz no momento da análise e, consequentemente, reduz os valores de AAT, podendo ter interferido diretamente na correlação da duplicata no papel filtro. Por esse motivo foi realizado uma subanálise com somente as amostras que apresentaram os dois valores da duplicata no eluato do papel filtro sem turbidez ($n = 116$) e então foi encontrada uma boa correlação ($r = 0,84$). Infelizmente nessa subanálise nenhum paciente com deficiência de AAT foi incluído, o que faz com que esse achado possa não ser representativo para a população de deficientes de AAT. Nenhum estudo publicado na literatura comenta sobre a reprodutibilidade entre as amostras de soro e em papel filtro, tão pouco

sobre a interferência da turbidez nas amostras, porém esse achado sugere que as amostras que apresentarem turbidez devam ser interpretadas com cautela.

É importante considerar algumas particularidades do método aplicado nesta pesquisa em relação ao tipo do papel filtro. Levou-se em consideração o tamanho do picote do papel filtro e a quantidade de solução tampão para a formação do eluato, nome e modelo do equipamento utilizado para análise do eluato e, por fim, o tempo necessário de contato do picote do papel filtro com a solução tampão. Nos próximos parágrafos serão abordados esses tópicos, confrontando os métodos publicados por diferentes estudos.

Os métodos utilizados no presente estudo foram baseados em estudos prévios, desenvolvidos para a validação da técnica e triagem de pacientes com deficiência de AAT. Após uma revisão na literatura observou-se que os métodos descritos nos diferentes estudos são muito semelhantes, porém diferem em alguns aspectos técnicos. O papel filtro utilizado neste estudo, marca Whatman 903TM (Schiecher & Schuell, Bioscience Inc., Keene, NH, USA), é o utilizado por todos os autores de estudos com análise da AAT em papel filtro (63, 67, 68, 83). No entanto, foi encontrada controvérsia em relação ao tamanho do diâmetro do papel filtro e à quantidade de solução tampão para a formação dos eluatos. No presente estudo foi realizado um picote de 6 mm de diâmetro no papel filtro adicionado a 200 μ L de solução tampão, conforme é utilizado no Hospital Vall d' Hebrorn em Barcelona - Espanha. Anteriormente, na validação da técnica realizada, no ano 2000, pela equipe do Hospital Vall d' Hebrorn em Barcelona – Espanha, publicada por Costa e colaboradores, foi utilizado picote de 3 mm do papel filtro eluído em 200 μ L de solução tampão (67). O picote de 6 mm, corresponde, teoricamente, a um volume de sangue de 18 μ L, e a adição de 200 μ L de solução tampão promove a diluição de 1:50. No estudo realizado por Gorrini e colaboradores também foi utilizado o picote de 6 mm do papel filtro, porém eluído em 266 μ L de solução tampão (68). Apesar da diferença entre os métodos dos estudos supracitados, ambos apresentaram boa reprodutibilidade do método.

Os estudos prévios que validaram o método de imunonefelometria em papel filtro, desenvolvidos por Wencker (83), Costa (67) e Gorrini e colaboradores (68), foram realizados com o equipamento Image Immuno Chemistry System, da

Beckmann. Para este estudo, inicialmente, tentou-se processar as amostras neste equipamento. Entretanto, não foi possível realizar a análise das amostras com diluição 1:1, o que impossibilitou a realização do presente estudo com o equipamento Beckman. Solicitamos a assistência técnica para a alteração do programa do equipamento em relação à diluição, porém não foi autorizada pela Beckman. Gorrini e colaboradores utilizaram o equipamento antigo da Beckman que possibilita a diluição 1:1, enquanto que Costa e colaboradores e Wencker e colaboradores realizaram uma alteração no equipamento para permitir a diluição para 1:1 (67, 68, 83). Segundo informações do grupo de pesquisadores do Hospital Vall d' Hebró em Barcelona – Espanha, estes já não utilizam o equipamento da Beckman desde 2002, realizando a análise das amostras no equipamento da Siemens BNII, porém não possuem publicação com dados obtidos a partir desse equipamento. Finalmente, foi decidido utilizar o equipamento da Siemens BNII, que permite a diluição 1:1, o qual se mostrou muito fácil e prático no seu uso.

Outra particularidade do método de dosagem no papel filtro é o tempo necessário para o contato do picote do papel filtro com a solução tampão. Após a preparação da amostra, os estudos recomendam que a mesma permaneça durante 12 horas a 4°C, e seja posteriormente centrifugada antes da sua análise (67, 68). Ao investigar a estabilidade de eluatos preparados por 12 e 36 horas, não foi encontrada boa correlação entre os valores dos dois grupos ($r^2 = 0,60$), evidenciando que o eluato perde a sua estabilidade se analisado após 12 horas da sua preparação, como recomendado.

A técnica em papel filtro para dosagem da alfa-1 antitripsina foi publicada pela primeira vez em 2000 por Costa e colaboradores e após seis anos por Gorrini e Colaboradores. O desenvolvimento dessa técnica teve um papel fundamental para o diagnóstico da deficiência de AAT em diversos países, principalmente na expansão de programas de triagem e detecção que, por sua vez, são fundamentais para a melhor compreensão dessa condição.

Conforme já mencionado as orientações mais recentes da OMS e ATS/ERS, é o estabelecimento de programas de triagem para a detecção da deficiência de AAT, em decorrência da sua prevalência e subdiagnóstico. O rastreamento dessa condição, utilizando a triagem neonatal, pode ser uma alternativa factível para a

detecção precoce. O programa de triagem neonatal foi introduzido em 1960, pelo pesquisador Robert Guthrie, ao demonstrar que a fenilcetonúria (PKU) poderia ser diagnosticada logo após o nascimento através da determinação da concentração da fenilalanina em amostras de sangue colhido em papel filtro (85).

Desde então, programas de triagem neonatal em todo o mundo têm utilizado esse recurso para o diagnóstico precoce de diversas doenças. No Brasil, o programa de triagem neonatal teve início em 1976 com a triagem para PKU e em 1980 foi introduzido o teste para hipotireoidismo congênito (86). Em 1983 o teste do pezinho se tornou obrigatório no estado de São Paulo e em 1990 foi expandido para todo o território nacional através da Lei Federal Nº 8069 de 13/07/90. Atualmente, o teste envolve quatro doenças genéticas, fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, hemoglobinopatias e a fibrose cística. Esse programa nacional tem trazido inúmeros benefícios à população, principalmente a possibilidade de tratamento precoce e melhora do prognóstico (73). A validação da técnica de papel filtro para a deficiência de AAT possibilitará a sua inserção em programas de triagem neonatal no Brasil, como no teste do pezinho. A introdução da dosagem de AAT no teste do pezinho traria um grande benefício, pois permitiria o diagnóstico precoce da deficiência e a educação dos familiares e parentes, além da possibilidade de aconselhamento genético aos casais. A deficiência de AAT é mais frequente que as atuais deficiências analisadas no teste do pezinho. Em acréscimo, a detecção precoce da deficiência de AAT não requer qualquer intervenção medicamentosa ou de reposição. A intervenção é estritamente baseada na orientação familiar, com o afastamento de fatores de risco, principalmente do tabagismo, uma vez que se sabe que os pacientes com deficiência de AAT que fumam aumentam em 200 vezes a chance de desenvolver enfisema pulmonar (87, 88).

A triagem neonatal é um programa valioso de prevenção de saúde pública que continua a evoluir para melhorar a saúde da população. Em abril de 2009 a coordenação americana de genética regional e triagem neonatal realizou uma reunião, para discutir os programas de triagem neonatal. No documento publicado a partir dessa reunião foi descrita a técnica de sangue em papel filtro como um recurso adicional e valioso, em que o seu uso irá facilitar e melhorar os programas de triagem nos próximos anos, sendo desejo do grupo incentivar a expansão da técnica

para outras doenças genéticas (73). Em vista disso, a inserção da deficiência de AAT em programas de triagem neonatal permitiria a melhor compreensão da doença, além de minimizar a atual condição de subdiagnóstico.

Não podemos esquecer do impacto que o não diagnóstico da deficiência de AAT pode acarretar, caso o paciente desenvolva enfisema pulmonar, uma das apresentações mais comuns na deficiência de AAT. Pacientes com enfisema têm altos gastos mensais com medicações, hospitalizações frequentes por exacerbações, além do tratamento com a terapia de reposição da proteína AAT, resultando em pior qualidade de vida desses indivíduos. Mesmo mantendo-se um ponto de corte com alta sensibilidade, o que resultará na possível repetição de exames, para afastar os falsos positivos, os gastos com exames serão extremamente mais baixos do que os gastos com o tratamento do indivíduo, caso ele desenvolva a doença pulmonar (89).

Assim, o método do papel filtro mostra ser uma excelente ferramenta para triagem populacional, uma vez que ele possibilita a acessibilidade à população, o que permitirá conhecer a real prevalência da deficiência de AAT, e a intervenção precoce pela educação.

8. LIMITAÇÕES

Como descrito anteriormente, o método de imunonefelometria no soro pode superestimar a concentração de AAT em até 35-40%, podendo se classificar, erroneamente, como normais, pessoas com deficiência de AAT, principalmente com deficiência intermediária. Para maior precisão do diagnóstico, o recomendado é a posterior realização de testes qualitativos, como a fenotipagem ou a genotipagem.

O número de pacientes com deficiência de AAT foi pequeno. Entretanto, pode-se observar que as dosagens das três amostras com deficiência de AAT estão exatamente sobre a linha de identidade, mostrando que os valores foram lineares. Além disso, foi realizado o teste estatístico “*bootstrap*” para minimizar este fator.

O ponto de corte deste estudo para o valor sérico foi baseado em publicações prévias, pois não conhecemos esse valor na população brasileira. Entretanto, é conhecido que existe pouca variabilidade desse valor em diferentes países.

Nesta pesquisa foi encontrado alto valor de sensibilidade para o ponto de corte calculado. Entretanto a especificidade foi um pouco mais baixa, tendo como consequência resultados falsos positivos. De acordo com a técnica em papel filtro, é necessária a realização de 32 testes para a detecção de três indivíduos com valores abaixo do máximo do intervalo de confiança (2,64 mg/dL) para o ponto de corte para deficiência de AAT, ou seja, 16% da amostra estudada em papel filtro terá que realizar a dosagem sérica para que se confirme o diagnóstico da deficiência.

9. CONCLUSÃO

A validação e o desenvolvimento do método para quantificação da AAT em papel filtro em 192 pacientes com DPOC nos permitiu concluir que o método em papel filtro para dosagem da AAT:

- É uma excelente alternativa para a triagem de pacientes com deficiência de AAT, pois possui uma alta sensibilidade e especificidade, com baixos valores preditivos positivo e negativo. Em vista disso, o método se torna uma atraente solução para a atual situação de subdiagnóstico da deficiência de AAT, pois oferece acessibilidade e baixo custo;
- Não é um método quantitativo, ou seja, não se pode estipular um valor sérico a partir das dosagens em papel filtro, sendo obrigatória a escolha de um ponto de corte e aconselhado o uso do intervalo de confiança para minimizar os diagnósticos falsos negativos;
- Deve ser utilizado com cautela quando apresentar turbidez, pois esse fator reduz a reflexão da luz no momento da análise e, consequentemente, reduz os valores de AAT;
- Necessita ser analisado 12 horas após a formação do eluato, conforme descrito na literatura, pois após 36 horas o eluato perde sua estabilidade.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007 Sep 15;176(6):532-55. PubMed PMID: 17507545.
2. Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. Apr 7;379(9823):1341-51. PubMed PMID: 22314182. Epub 2012/02/09. eng.
3. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2006 Sep;28(3):523-32. PubMed PMID: 16611654. Epub 2006/04/14. eng.
4. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet*. 2007 Sep 1;370(9589):741-50. PubMed PMID: 17765523. Epub 2007/09/04. eng.
5. Menezes AM, Perez-Padilla R, Jardim JR, Muino A, Lopez MV, Valdivia G, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*. 2005 Nov 26;366(9500):1875-81. PubMed PMID: 16310554.
6. van den Boom G, van Schayck CP, van Mollen MP, Tirimanna PR, den Otter JJ, van Grunsven PM, et al. Active detection of chronic obstructive pulmonary disease and asthma in the general population. Results and economic consequences of the DIMCA program. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Dec;158(6):1730-8. PubMed PMID: 9847260. Epub 1998/12/16. eng.
7. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003 Oct;22(4):672-88. PubMed PMID: 14582923. Epub 2003/10/30. eng.
8. Silverman EK, Chapman HA, Drazen JM, Weiss ST, Rosner B, Campbell EJ, et al. Genetic epidemiology of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. Risk to relatives for airflow obstruction and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Jun;157(6 Pt 1):1770-8. PubMed PMID: 9620904. Epub 1998/06/25. eng.
9. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004 Jun 24;350(26):2645-53. PubMed PMID: 15215480. Epub 2004/06/25. eng.
10. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet*. 2005 Jun 25-Jul 1;365(9478):2225-36. PubMed PMID: 15978931. Epub 2005/06/28. eng.
11. Blanco I, de Serres FJ, Fernandez-Bustillo E, Lara B, Miravittles M. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries. *Eur Respir J*. 2006 Jan;27(1):77-84. PubMed PMID: 16387939. Epub 2006/01/03. eng.
12. Colp C, Pappas J, Moran D, Lieberman J. Variants of alpha 1-antitrypsin in Puerto Rican children with asthma. *Chest*. 1993 Mar;103(3):812-5. PubMed PMID: 8449073. Epub 1993/03/01. eng.
13. Laurell CB, Eriksson A. The electrophoretic alpha 1-globulin pattern of serum in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1963;15:132-40.
14. Fairbanks KD, Tavill AS. Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review. *Am J Gastroenterol*. 2008 Aug;103(8):2136-41; quiz 42. PubMed PMID: 18796107. Epub 2008/09/18. eng.
15. Smith KC, Pittelkow MR, Su WP. Panniculitis associated with severe alpha 1-antitrypsin deficiency. Treatment and review of the literature. *Arch Dermatol*. 1987 Dec;123(12):1655-61. PubMed PMID: 3318708. Epub 1987/12/01. eng.
16. Mazodier P, Elzouki AN, Segelmark M, Eriksson S. Systemic necrotizing vasculitides in severe alpha1-antitrypsin deficiency. *QJM*. 1996 Aug;89(8):599-611. PubMed PMID: 8935481. Epub 1996/08/01. eng.

17. Mayer AS, Stoller JK, Vedal S, Ruttenber AJ, Strand M, Sandhaus RA, et al. Risk factors for symptom onset in PI*Z alpha-1 antitrypsin deficiency. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2006;1(4):485-92. PubMed PMID: 18044105. Epub 2007/11/30. eng.
18. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Oct 1;168(7):818-900. PubMed PMID: 14522813. Epub 2003/10/03. eng.
19. Mornex JF, Chytil-Weir A, Martinet Y, Courtney M, LeCocq JP, Crystal RG. Expression of the alpha-1-antitrypsin gene in mononuclear phagocytes of normal and alpha-1-antitrypsin-deficient individuals. *J Clin Invest*. 1986 Jun;77(6):1952-61. PubMed PMID: 3486887. Epub 1986/06/01. eng.
20. Cichy J, Potempa J, Travis J. Biosynthesis of alpha1-proteinase inhibitor by human lung-derived epithelial cells. *J Biol Chem*. 1997 Mar 28;272(13):8250-5. PubMed PMID: 9079644. Epub 1997/03/28. eng.
21. DeMeo DL, Silverman EK. Alpha1-antitrypsin deficiency. 2: genetic aspects of alpha(1)-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. *Thorax*. 2004 Mar;59(3):259-64. PubMed PMID: 14985567. Epub 2004/02/27. eng.
22. Wood AM, Stockley RA. Alpha one antitrypsin deficiency: from gene to treatment. *Respiration*. 2007;74(5):481-92. PubMed PMID: 17671403. Epub 2007/08/03. eng.
23. Stockley RA. Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Nov;160(5 Pt 2):S49-52. PubMed PMID: 10556170. Epub 1999/11/11. eng.
24. Elliott PR, Lomas DA, Carrell RW, Abrahams JP. Inhibitory conformation of the reactive loop of alpha 1-antitrypsin. *Nat Struct Biol*. 1996 Aug;3(8):676-81. PubMed PMID: 8756325. Epub 1996/08/01. eng.
25. Riva A, Kohane IS. SNPper: retrieval and analysis of human SNPs. *Bioinformatics*. 2002 Dec;18(12):1681-5. PubMed PMID: 12490454. Epub 2002/12/20. eng.
26. Schroeder WT, Miller MF, Woo SL, Saunders GF. Chromosomal localization of the human alpha 1-antitrypsin gene (PI) to 14q31-32. *Am J Hum Genet*. 1985 Sep;37(5):868-72. PubMed PMID: 3876766. Epub 1985/09/01. eng.
27. Vidal R, Blanco I, Casas F, Jardi R, Miravittles M, Committee on the National Registry of Individuals with Alpha-1 Antitrypsin D. [Guidelines for the diagnosis and management of alpha-1 antitrypsin deficiency]. *Archivos de bronconeumologia*. 2006 Dec;42(12):645-59. PubMed PMID: 17178069. Diagnostico y tratamiento del deficit de alfa-1-antitripsina.
28. Bernspang E, Sveger T, Piitulainen E. Respiratory symptoms and lung function in 30-year-old individuals with alpha-1-antitrypsin deficiency. *Respir Med*. 2007 Sep;101(9):1971-6. PubMed PMID: 17532199. Epub 2007/05/29. eng.
29. Stoller JK. Key current clinical issues in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Respir Care*. 2003 Dec;48(12):1216-21; discussion 21-4. PubMed PMID: 14651762. Epub 2003/12/04. eng.
30. Stoller JK, Sandhaus RA, Turino G, Dickson R, Rodgers K, Strange C. Delay in diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency: a continuing problem. *Chest*. 2005 Oct;128(4):1989-94. PubMed PMID: 16236846. Epub 2005/10/21. eng.
31. Stoller JK, Tomashefski J, Jr., Crystal RG, Arroliga A, Strange C, Killian DN, et al. Mortality in individuals with severe deficiency of alpha1-antitrypsin: findings from the National Heart, Lung, and Blood Institute Registry. *Chest*. 2005 Apr;127(4):1196-204. PubMed PMID: 15821195. Epub 2005/04/12. eng.
32. Miravittles M. Alpha1-antitrypsin deficiency: epidemiology and prevalence. *Respir Med*. 2000 Aug;94 Suppl C:S12-5. PubMed PMID: 10954249. Epub 2000/08/23. eng.
33. Tobin MJ, Cook PJ, Hutchison DC. Alpha 1 antitrypsin deficiency: the clinical and physiological features of pulmonary emphysema in subjects homozygous for Pi type Z. A survey by the British Thoracic Association. *Br J Dis Chest*. 1983 Jan;77(1):14-27. PubMed PMID: 6602621. Epub 1983/01/01. eng.

34. de Serres FJ. Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. *Chest*. 2002 Nov;122(5):1818-29. PubMed PMID: 12426287. Epub 2002/11/12. eng.
35. de Serres FJ, Blanco I, Fernandez-Bustillo E. Genetic epidemiology of alpha-1 antitrypsin deficiency in southern Europe: France, Italy, Portugal and Spain. *Clin Genet*. 2003 Jun;63(6):490-509. PubMed PMID: 12786756. Epub 2003/06/06. eng.
36. Alpha 1-antitrypsin deficiency: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ*. 1997;75(5):397-415. PubMed PMID: 9447774. Epub 1997/01/01. eng.
37. Luisetti M, Seersholm N. Alpha1-antitrypsin deficiency. 1: epidemiology of alpha1-antitrypsin deficiency. *Thorax*. 2004 Feb;59(2):164-9. PubMed PMID: 14760160. Epub 2004/02/05. eng.
38. Lieberman J, Winter B, Sastre A. Alpha 1-antitrypsin Pi-types in 965 COPD patients. *Chest*. 1986 Mar;89(3):370-3. PubMed PMID: 3485034. Epub 1986/03/01. eng.
39. Sveger T. alpha 1-antitrypsin deficiency in early childhood. *Pediatrics*. 1978 Jul;62(1):22-5. PubMed PMID: 308215. Epub 1978/07/01. eng.
40. O'Brien ML, Buist NR, Murphey WH. Neonatal screening for alpha1-antitrypsin deficiency. *J Pediatr*. 1978 Jun;92(6):1006-10. PubMed PMID: 307054. Epub 1978/06/01. eng.
41. Blanco I, Fernandez-Bustillo E, de Serres FJ, Alkassam D, Rodriguez Menendez C. [PI*S and PI*Z alpha 1-antitrypsin deficiency: estimated prevalence and number of deficient subjects in Spain]. *Med Clin (Barc)*. 2004 Dec 4;123(20):761-5. PubMed PMID: 15607066. Epub 2004/12/21. Deficit de alfa-1-antitripsina en Espana (variantes deficientes PI*S y PI*Z): prevalencia estimada y numero de sujetos calculados para cada fenotipo. spa.
42. Stockley RA, Luisetti M, Miravittles M, Piitulainen E, Fernandez P. Ongoing research in Europe: Alpha One International Registry (AIR) objectives and development. *Eur Respir J*. 2007 Mar;29(3):582-6. PubMed PMID: 17329492. Epub 2007/03/03. eng.
43. Hamosh A, FitzSimmons SC, Macek M, Jr., Knowles MR, Rosenstein BJ, Cutting GR. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J Pediatr*. 1998 Feb;132(2):255-9. PubMed PMID: 9506637. Epub 1998/03/20. eng.
44. Lai EC, Kao FT, Law ML, Woo SL. Assignment of the alpha 1-antitrypsin gene and a sequence-related gene to human chromosome 14 by molecular hybridization. *Am J Hum Genet*. 1983 May;35(3):385-92. PubMed PMID: 6602546. Epub 1983/05/01. eng.
45. Fagerhol MK, Laurell CB. The polymorphism of "prealbumins" and alpha-1-antitrypsin in human sera. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1967 May;16(2):199-203. PubMed PMID: 4166396.
46. Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Kohnlein T, Welte T. The discovery of alpha1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med*. Aug;105(8):1129-39. PubMed PMID: 21367592. Epub 2011/03/04. eng.
47. Lomas DA, Mahadeva R. Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest*. 2002 Dec;110(11):1585-90. PubMed PMID: 12464660. Epub 2002/12/05. eng.
48. Johnson D, Travis J. Structural evidence for methionine at the reactive site of human alpha-1-proteinase inhibitor. *J Biol Chem*. 1978 Oct 25;253(20):7142-4. PubMed PMID: 701239. Epub 1978/10/25. eng.
49. Elliott PR, Abrahams JP, Lomas DA. Wild-type alpha 1-antitrypsin is in the canonical inhibitory conformation. *J Mol Biol*. 1998 Jan 23;275(3):419-25. PubMed PMID: 9466920. Epub 1998/02/19. eng.
50. Wilczynska M, Fa M, Karolin J, Ohlsson PI, Johansson LB, Ny T. Structural insights into serpin-protease complexes reveal the inhibitory mechanism of serpins. *Nat Struct Biol*. 1997 May;4(5):354-7. PubMed PMID: 9145103. Epub 1997/05/01. eng.
51. Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*. 2000 Oct 19;407(6806):923-6. PubMed PMID: 11057674. Epub 2000/11/01. eng.

52. Huber R, Carrell RW. Implications of the three-dimensional structure of alpha 1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry*. 1989 Nov 14;28(23):8951-66. PubMed PMID: 2690952. Epub 1989/11/14. eng.
53. Dafforn TR, Mahadeva R, Elliott PR, Sivasothy P, Lomas DA. A kinetic mechanism for the polymerization of alpha1-antitrypsin. *J Biol Chem*. 1999 Apr 2;274(14):9548-55. PubMed PMID: 10092640. Epub 1999/03/27. eng.
54. Kohnlein T, Welte T. Alpha-1 antitrypsin deficiency: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Am J Med*. 2008 Jan;121(1):3-9. PubMed PMID: 18187064. Epub 2008/01/12. eng.
55. Carrell RW, Lomas DA. Alpha1-antitrypsin deficiency--a model for conformational diseases. *N Engl J Med*. 2002 Jan 3;346(1):45-53. PubMed PMID: 11778003. Epub 2002/01/05. eng.
56. Lomas DA, Evans DL, Finch JT, Carrell RW. The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature*. 1992 Jun 18;357(6379):605-7. PubMed PMID: 1608473. Epub 1992/06/18. eng.
57. Gooptu B, Ekeowa UI, Lomas DA. Mechanisms of emphysema in alpha1-antitrypsin deficiency: molecular and cellular insights. *Eur Respir J*. 2009 Aug;34(2):475-88. PubMed PMID: 19648523. Epub 2009/08/04. eng.
58. Spencer LT, Paone G, Krein PM, Rouhani FN, Rivera-Nieves J, Brantly ML. Role of human neutrophil peptides in lung inflammation associated with alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Mar;286(3):L514-20. PubMed PMID: 14594730. Epub 2003/11/05. eng.
59. Tomashefski JF, Jr., Crystal RG, Wiedemann HP, Mascha E, Stoller JK. The bronchopulmonary pathology of alpha-1 antitrypsin (AAT) deficiency: findings of the Death Review Committee of the national registry for individuals with Severe Deficiency of Alpha-1 Antitrypsin. *Hum Pathol*. 2004 Dec;35(12):1452-61. PubMed PMID: 15619203. Epub 2004/12/25. eng.
60. Dowson LJ, Guest PJ, Stockley RA. The relationship of chronic sputum expectoration to physiologic, radiologic, and health status characteristics in alpha(1)-antitrypsin deficiency (PiZ). *Chest*. 2002 Oct;122(4):1247-55. PubMed PMID: 12377849. Epub 2002/10/16. eng.
61. Ferrarotti I, Scabini R, Campo I, Ottaviani S, Zorzetto M, Gorrini M, et al. Laboratory diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency. *Transl Res*. 2007 Nov;150(5):267-74. PubMed PMID: 17964515. Epub 2007/10/30. eng.
62. Miravittles M, Herr C, Ferrarotti I, Jordi R, Rodriguez-Frias F, Luisetti M, et al. Laboratory testing of individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency in three European centres. *Eur Respir J*. 2010 May;35(5):960-8. PubMed PMID: 20436173.
63. Rodriguez F, Jordi R, Costa X, Cotrina M, Galimany R, Vidal R, et al. Rapid screening for alpha1-antitrypsin deficiency in patients with chronic obstructive pulmonary disease using dried blood specimens. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Sep 15;166(6):814-7. PubMed PMID: 12231490. Epub 2002/09/17. eng.
64. Snyder MR, Katzmann JA, Butz ML, Wiley C, Yang P, Dawson DB, et al. Diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency: An algorithm of quantification, genotyping, and phenotyping. *Clin Chem*. 2006 Dec;52(12):2236-42. PubMed PMID: 17053153. Epub 2006/10/21. eng.
65. Ottaviani S, Gorrini M, Scabini R, Kadija Z, Paracchini E, Mariani F, et al. C reactive protein and alpha1-antitrypsin: relationship between levels and gene variants. *Transl Res*. 2011 Jun;157(6):332-8. PubMed PMID: 21575917.
66. de la Roza C, Costa X, Vidal R, Vila S, Rodriguez-Frias F, Jordi R, et al. [Screening program for alpha-1 antitrypsin deficiency in patients with chronic obstructive pulmonary disease, using dried blood spots on filter paper]. *Arch Bronconeumol*. 2003 Jan;39(1):8-12. PubMed PMID: 12550013. Epub 2003/01/29. Programa de cribado para el deficit de alpha 1-antitripsina en pacientes con EPOC mediante el uso de gota de sangre en papel secante. spa.
67. Costa X, Jordi R, Rodriguez F, Miravittles M, Cotrina M, Gonzalez C, et al. Simple method for alpha1-antitrypsin deficiency screening by use of dried blood spot specimens. *Eur Respir J*. 2000 Jun;15(6):1111-5. PubMed PMID: 10885432. Epub 2000/07/08. eng.

68. Gorrini M, Ferrarotti I, Lupi A, Bosoni T, Mazzola P, Scabini R, et al. Validation of a rapid, simple method to measure alpha1-antitrypsin in human dried blood spots. *Clin Chem*. 2006 May;52(5):899-901. PubMed PMID: 16638961. Epub 2006/04/28. eng.
69. Bals R, Koczulla R, Kotke V, Andress J, Blackert K, Vogelmeier C. Identification of individuals with alpha-1-antitrypsin deficiency by a targeted screening program. *Respir Med*. 2007 Aug;101(8):1708-14. PubMed PMID: 17428650. Epub 2007/04/13. eng.
70. Bornhorst JA, Procter M, Meadows C, Ashwood ER, Mao R. Evaluation of an integrative diagnostic algorithm for the identification of people at risk for alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Clin Pathol*. 2007 Sep;128(3):482-90. PubMed PMID: 17709323. Epub 2007/08/22. eng.
71. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Sep 15;176(6):532-55. PubMed PMID: 17507545. Epub 2007/05/18. eng.
72. Celli BR, MacNee W, Force AET. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2004 Jun;23(6):932-46. PubMed PMID: 15219010.
73. Benkendorf J, Goodspeed T, Watson MS. Newborn screening residual dried blood spot use for newborn screening quality improvement. *Genet Med*. Dec;12(12 Suppl):S269-72. PubMed PMID: 21150375. Epub 2010/12/22. eng.
74. Qaseem A, Wilt TJ, Weinberger SE, Hanania NA, Criner G, van der Molen T, et al. Diagnosis and management of stable chronic obstructive pulmonary disease: a clinical practice guideline update from the American College of Physicians, American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, and European Respiratory Society. *Annals of internal medicine*. 2011 Aug 2;155(3):179-91. PubMed PMID: 21810710.
75. Cazzola M, MacNee W, Martinez FJ, Rabe KF, Franciosi LG, Barnes PJ, et al. Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers. *Eur Respir J*. 2008 Feb;31(2):416-69. PubMed PMID: 18238951. Epub 2008/02/02. eng.
76. Hankinson JL, Odencrantz JR, Fedan KB. Spirometric reference values from a sample of the general U.S. population. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Jan;159(1):179-87. PubMed PMID: 9872837.
77. Malm J, Hellman J, Magnusson H, Laurell CB, Lilja H. Isolation and characterization of the major gel proteins in human semen, semenogelin I and semenogelin II. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1996 May 15;238(1):48-53. PubMed PMID: 8665951.
78. Miller F, Kuschner M. Alpha1-antitrypsin deficiency, emphysema, necrotizing angitis and glomerulonephritis. *Am J Med*. 1969 Apr;46(4):615-23. PubMed PMID: 4389326. Epub 1969/04/01. eng.
79. Caggana M, Conroy JM, Pass KA. Rapid, efficient method for multiplex amplification from filter paper. *Hum Mutat*. 1998;11(5):404-9. PubMed PMID: 9600459. Epub 1998/05/26. eng.
80. Simsek H, Pinar A, Altinbas A, Alp A, Balaban YH, Buyukasik Y, et al. Cutoff level to detect heterozygous alpha 1 antitrypsin deficiency in Turkish population. *J Clin Lab Anal*. 25(4):296-9. PubMed PMID: 21786332. Epub 2011/07/26. eng.
81. Zorzetto M, Russi E, Senn O, Imboden M, Ferrarotti I, Tinelli C, et al. SERPINA1 gene variants in individuals from the general population with reduced alpha1-antitrypsin concentrations. *Clin Chem*. 2008 Aug;54(8):1331-8. PubMed PMID: 18515255. Epub 2008/06/03. eng.
82. Corda L, Bertella E, Pini L, Pezzini A, Medicina D, Boni E, et al. Diagnostic flow chart for targeted detection of alpha1-antitrypsin deficiency. *Respir Med*. 2006 Mar;100(3):463-70. PubMed PMID: 16043335. Epub 2005/07/27. eng.
83. Wencker M, Marx A, Konietzko N, Schaefer B, Campbell EJ. Screening for alpha1-Pi deficiency in patients with lung diseases. *Eur Respir J*. 2002 Aug;20(2):319-24. PubMed PMID: 12212962. Epub 2002/09/06. eng.

84. Kwon C, Farrell PM. The magnitude and challenge of false-positive newborn screening test results. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2000 Jul;154(7):714-8. PubMed PMID: 10891024. Epub 2000/07/13. eng.
85. Guthrie R. The origin of newborn screening. *Screening : journal of the International Society of Neonatal Screening.* 1992;1:5-15. PubMed PMID: 11615143.
86. Lopes ME. The successful "Guthrie test" celebrates its 10th birthday in Brazil! *Ciencia & saude coletiva.* 2011;16 Suppl 1:716-7. PubMed PMID: 21528612.
87. Piitulainen E, Eriksson S. Decline in FEV1 related to smoking status in individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Eur Respir J.* 1999 Feb;13(2):247-51. PubMed PMID: 10065663. Epub 1999/03/05. eng.
88. Janus ED, Phillips NT, Carrell RW. Smoking, lung function, and alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lancet.* 1985 Jan 19;1(8421):152-4. PubMed PMID: 2857224. Epub 1985/01/19. eng.
89. Kageha S, Okoth V, Kadima S, Vihenda S, Okapesi E, Nyambura E, et al. Discrepant test findings in early infant diagnosis of HIV in a national reference laboratory in Kenya: challenges and opportunities for programs. *J Trop Pediatr.* Aug;58(4):247-52. PubMed PMID: 22052701. Epub 2011/11/05. eng.

Anexos

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome do Estudo: “Prevalência da deficiência de alfa1- antitripsina no Brasil – Fase II”

1-Esta pesquisa visa obter a porcentagem de pessoas com deficiência de alfa-1 antitripsina no Brasil. Sua participação é voluntária. Você deve compreender perfeitamente os benefícios e danos potenciais antes de aceitar a participar. Isto é conhecido como “consentimento Informado”

2-A deficiência de alfa-1 antitripsina, é um mal genético hereditário que causa níveis baixos ou nulos no sangue da proteína alfa-1 antitripsina (AAT). Se você tem deficiência de alfa-1, pode desenvolver enfermidade pulmonar e/ou hepática grave, ou transmitir esta deficiência a seus filhos.

3-Os exames para dosagem de alfa1 no sangue são fáceis, rápidos e precisos. São utilizados dois tipos de exames. Um examina seu sangue em busca de algumas proteínas que indicam se você tem ou não a doença de deficiência de alfa-1. O outro exame determina o tipo de proteína AAT que você tem em seu sangue. Ambos os exames são feitos com apenas uma amostra de sangue.

4-Caso aceite participar após o preenchimento dos questionários será realizado uma picada no seu dedo polegar da mão esquerda, com uma lanceta (picadora estéril), para a coleta de gotas de sangue em papel de filtro. A amostra será enviada ao laboratório para ser analisada e o resultado entregue durante a segunda consulta médica, após 2 meses.

5- Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Rodrigo Russo CRM SP 131708, que pode ser encontrado no endereço: Rua dos Açores, 310 bairro Jardim Luzitânia - Centro de Reabilitação Pulmonar LESF/UNIFESP Telefone 5904-8000 e 55724301. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@unifesp.br

6- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

7- Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

8- Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação

financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

9-Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

10 -Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. "Prevalência da Deficiência de alfa1- antitripsina no Brasil".

Eu discuti com o Dr. Rodrigo Russo sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____ Data ____/____/____

Assinatura do paciente/representante legal

_____ Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

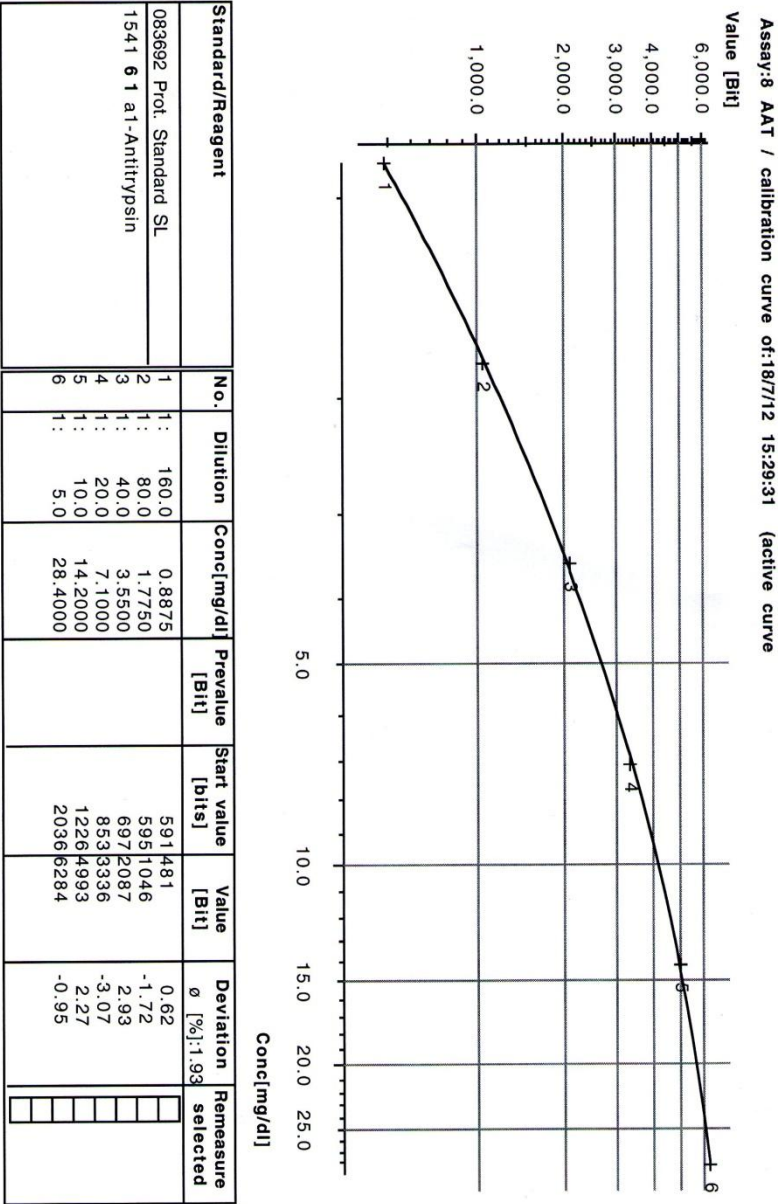
Para casos de voluntários menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Anexo 2: Curva de calibração do equipamento BNII



Anexo 3: Controles diários do equipamento BNII para proteína AAT em diferentes níveis de concentração sérica (L= baixo, M= médio e H= alto), para os três dias de análise

Control Journal

19 July, 2012

11:05

Shown: with results All assays

Prot. Control SL/H

AAT-b	-1.4 %	210.00 mg/dl	(213.00 mg/dl)
AAT	-6.6 %	199.00 mg/dl	(213.00 mg/dl)

Prot. Control SL/L

AAT-b	0.0 %	101.00 mg/dl	(101.00 mg/dl)
AAT	-4.4 %	96.60 mg/dl	(101.00 mg/dl)

Prot. Control SL/M

AAT-b	8.8 %	173.00 mg/dl	(159.00 mg/dl)
AAT	-0.6 %	158.00 mg/dl	(159.00 mg/dl)

Control Journal

18 July, 2012

16:06

Shown: with results All assays

Prot. Control SL/H

AAT-b	2.8 %	219.00 mg/dl	(213.00 mg/dl)
AAT	-7.5 %	197.00 mg/dl	(213.00 mg/dl)

Prot. Control SL/L

AAT-b	-1.0 %	100.00 mg/dl	(101.00 mg/dl)
AAT	-1.6 %	99.40 mg/dl	(101.00 mg/dl)

Prot. Control SL/M

AAT-b	1.9 %	162.00 mg/dl	(159.00 mg/dl)
AAT	1.3 %	161.00 mg/dl	(159.00 mg/dl)

Control Journal

20 July, 2012

16:01

Shown: with results All assays**Prot. Control SL/H**

AAT-b	0.5 %	214.00 mg/dl	(213.00 mg/dl)
AAT	-7.5 %	197.00 mg/dl	(213.00 mg/dl)

Prot. Control SL/L

AAT-b	-10.9 %	90.00 mg/dl	(101.00 mg/dl)
AAT	-3.1 %	97.90 mg/dl	(101.00 mg/dl)

Prot. Control SL/M

AAT-b	-0.6 %	158.00 mg/dl	(159.00 mg/dl)
AAT	-2.5 %	155.00 mg/dl	(159.00 mg/dl)

Anexo 4: Aprovação do comitê de ética e pesquisa

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 11 de junho de 2010.
CEP 0633/10

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) RODRIGO RUSSO
Co-Investigadores: Aquiles A Camelier, Fernando Lundgren, Leandro Fritscher, Maria Vera Cruz de Oliveira, Gildo Francisco dos Santos Jr, Oliver Nascimento, José Roberto de Brito Jardim (orientador)
Disciplina/Departamento: Pneumologia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Prevalência da deficiência de alfa-1 antitripsina no Brasil”**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo epidemiológico.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Risco mínimo, desconforto leve, envolvendo coleta de sangue.

OBJETIVOS: Avaliar a prevalência da deficiência de alfa-1-antitripsina no Brasil e propor medidas para seu manejo.

RESUMO: Estudo transversal, envolvendo 1000 pacientes com DPOC (GOLD), com idade acima de 40 anos, de ambos os sexos, pertencentes a 4 estados brasileiros (São Paulo, Pernambuco, Bahia e Rio Grande do Sul) nos quais será realizado por nefelometria a dosagem de alfa-1-antitripsina (AAT) e em casos de deficiência, a genotipagem. Será realizada dosagem de alfa-1-antitripsina no plasma e no papel de filtro em 20 pacientes, para validação do método de papel de filtro, divididos em dois grupos: o primeiro grupo será composto por 10 pacientes estáveis com deficiência de AAT confirmada e o outro grupo composto por 10 indivíduos sem a doença. Numa segunda fase, serão incluídos 1000 pacientes com DPOC com VEF1<0,70 pós broncodilatador. Os pacientes serão recrutados dos seguintes serviços: Centro de Reabilitação Pulmonar Lar Escola São Francisco/UNIFESP, Serviço de doenças do Aparelho Respiratório do Hospital do Servidor Público Estadual, Serviço de Pneumologia da PUCRS, Hospital Otávio de Freitas /Recife e disciplina de Pneumologia da Faculdade de Medicina da Bahia. Todos os pacientes deverão possuir espirometria pré e pós-broncodilatador realizados até 6 meses que antecedem a pesquisa. Serão preenchidos o questionário, termo de consentimento e coleta de gotas de sangue em um papel de filtro seco, que serão enviados para o laboratório central (Centro de Diagnóstico Brasil) em São Paulo. Em caso de dosagem de alfa-1-antitripsina abaixo de 11 mmol/L será realizada a genotipagem..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: As orientações mais recentes estabelece a necessidade de programas de triagem para a detecção de alfa-1-antitripsina em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. Esta estratégia é fundamental em países onde a doença está subdiagnosticada, como no Brasil, principalmente devido ao baixo índice de suspeita clínica entre os médicos..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo, apresentando carta de concordância dos locais onde a pesquisa será conduzida..

TCLE: Apresenta TCLEs para a fase I e fase II, encontrando-se adequados, contemplando a resolução 196/96.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R\$ 34356,69.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 6/6/2011 e 5/6/2012.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0633/10

O CEP - UNIFESP AGUARDA APROVAÇÃO DOS CEPs DAS INSTITUIÇÕES QUE PARTICIPARÃO DO ESTUDO